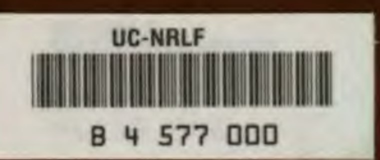




ARTHUR MEYER

Mikroskopisches Practicum II.

JENA
GUSTAV FISCHER
1908


Ex-libris
Charles Atwood
Kofoid

Botanische Practica.

Von

Dr. Arthur Meyer,
ord. Professor der Botanik an der Universität Marburg.

Zum Gebrauche in den Laboratorien und zum Selbstunterrichte.

II. Practicum.



Jena,
Verlag von Gustav Fischer.
1903.

Practicum der botanischen Bakterienkunde.

Einführung in die Methoden der botanischen Untersuchung und Bestimmung der Bakterienspezies.

Zum Gebrauche in botanischen, bakteriologischen und technischen Laboratorien sowie zum Selbstunterrichte.

Von

Dr. Arthur Meyer,

ordentl. Professor der Botanik, Direktor des botanischen Gartens und des botanischen Instituts der Universität Marburg.

Mit einer farbigen Tafel und 31 Abbildungen im Text.



Jena,
Verlag von Gustav Fischer.
1903.



Inhalt.

Vorrede und Einleitung.

Wenn ich gerade dieses Buch als zweites in der Reihe meiner Botanischen Praktika erscheinen lasse, so bestimmt mich dazu zuerst die Meinung, daß für ein derartiges Werkchen jetzt ein Bedürfnis vorhanden sei. Es fehlte ein Buch, welches den Botaniker in die für ihn wichtigsten Methoden der Bakterienkultur und Pilzkultur und in die wichtigsten physiologischen Methoden, welche zur Bestimmung der Bakterienspezies nötig sind, einführen konnte, sowie eine Anleitung zu einer für den zuletzt genannten Zweck genügend genauen mikroskopischen Untersuchung der Bakterien.

Ich glaube, daß eine solche Anleitung auch deshalb jetzt gerade recht kommt, weil die botanische Durcharbeitung der sporenbildenden Bakterienspezies ein immer dringenderes Bedürfnis wird und sowohl für die reine Botanik als auch für viele praktische Fächer von Bedeutung ist.

Dieses Buch ist selbstverständlich keine direkte Fortsetzung des „Ersten mikroskopischen Praktikums“, und letzteres steht nur insofern zu ihm in Beziehung, als derjenige, welcher letzteres durchgearbeitet hat, fähig sein wird, den mikroskopischen Teil der Uebungen, welche dieses Praktikum bietet, zu bewältigen.

Einige Punkte, die hier Erwähnung finden, werden nur verständlich werden, wenn ich darauf hinweise. dass sich an dieses Werkchen ein Praktikum über Pilze direkt anschließen soll. Ich habe nur aus Zweckmässigkeitsgründen davon abgesehen, beide Praktika zu vereinigen; ich habe das Bakterienpraktikum vorausgehen lassen, weil die Kulturmethoden, welche man für die Bakterien verwendet, auch alle für die Pilze verwendbar sind, nicht umgekehrt, und habe es allein erscheinen lassen, weil für manche Praktiker die Pilze von geringerem Interesse sind als die Bakterien. Die Arbeiten, zu welchen dieses Buch die Anleitung giebt, lassen sich, wenn die Kapitel zu Hause vorher studiert werden, und das Laboratorium bequem eingerichtet ist, an den Vormittagen oder Nachmittagen eines Semesters durchführen.

Das Charakteristische des Buches liegt darin, daß soweit als möglich in allgemein orientierenden Kapiteln die theoretischen Grundlagen für die Uebungen gegeben werden, so daß der Praktikant wissen kann, weshalb er seine Arbeit so und nicht anders ausführen darf, und in Fällen, die nicht vorgesehen sind, auch später selbständig vorgehen kann.

Das Studium aller allgemeinen Kapitel ist also durchaus für das Verständnis und die tüchtige Ausführung der Uebungen nötig.

Das gilt auch für die erläuternden technischen Kapitel. So z. B. ist die richtige Handhabung des Sterilisationsverfahrens wesentlich abhängig von dem genauen Studium des ganzen Kapitel I und die Unkenntnis des Inhaltes von Kapitel I würde sich während aller Arbeiten fühlbar machen. Ebenso ist das Kapitel über die Nährböden genau durchzulesen, weil man sich sonst über den verschiedenen Wert der Nährböden nicht klar wird; weil wir ferner einzelne der beschriebenen Nährböden, die nicht in den Uebungen hergestellt werden, im Laufe der Uebungen gebrauchen; weil wir ohne Studium des Kapitels nichts erfahren würden über die Anwendung der Nährböden für die Speziesdiagnose u. s. w. Es würde also auch, ohne genaues Studium der erläuternden Kapitel, ein grosser Teil dessen nicht gelernt werden, was zur Ausführung von botanischen Arbeiten über Bakterien gewußt werden muß.

Dass in dem Praktikum die Resultate meiner eigenen Arbeiten über die Bakterien sowie die meiner Schüler vielfach benutzt worden sind, wird der Eigenart und Brauchbarkeit des Buches hoffentlich wesentlich zu Gute kommen.

Die Bakterien, welche ich zu den Uebungen anwenden lasse, sind leicht zu sammeln und leicht rein zu züchten, da sie überall im Boden und im Pferdemist vorkommen; sie können aber auch von Kràl (s. Kapitel XXIII) bezogen werden. Sollten die von Kràl bezogenen Spezies nicht in ihren Eigenschaften mit den Diagnosen (Kapitel XX) stimmen, so bin ich gern bereit, Kulturen, soweit sie mir zur Verfügung stehen, abzugeben.

Ich wünsche, daß dieses Werkchen manche Anregung zur weiteren Bearbeitung der botanisch noch sehr vernachlässigten Pflanzengruppe geben möge, zu deren Studium sie anleiten soll.

Botanisches Institut der Universität Marburg, 17. März 1903.

Arthur Meyer.

Kapitel I.

Ueber Sterilisation.

Litteratur.

Abel, *1900, S. 6.* — ***Behring,*** *Gesammelte Abhandlungen 1893, Leipzig.* — ***Cramer,*** *Die Ursache der Resistenz der Sporen gegen trockene Hitze; Archiv für Hygiene 1891, S. 71.* — ***Flügge,*** *1896, I, S. 435.* — ***Esmarch,*** *Die desinfizierende Wirkung des strömenden, überhitzten Dampfes; Zeitschrift für Hygiene 1888, Bd. V, S. 197.* — ***Globig,*** *Ueber einen Kartoffel-Bazillus mit ungewöhnlich widerstandsfähigen Sporen; Zeitschrift für Hygiene 1888, Bd. III, p. 322.* — ***Günther,*** *1898, S. 31.* — ***Heim,*** *1894, S. 53.* — ***Koch und Wolffhügel,*** *Untersuchungen über die Desinfektion mit heisser Luft; Mitteilungen aus dem Kaiserl. Ges.-Amt 1881, Bd. I, S. 301.* — ***v. Lingelsheim,*** *Ueber die milzbrandfeindlichen Wirkungen von Säuren und Alkalien im Blutserum; Zeitschrift für Hygiene 1890 8, S. 201.*

1. Allgemeines über Sterilisation.

Unter Sterilisation eines Gegenstandes versteht man die Befreiung desselben von allen lebenden Organismen. Die Methoden der Sterilisation haben für die Reinkultur der Bakterienspezies die größte Bedeutung, da die Reinkultur die absolute oder relative Sterilisation aller Nährböden, Gefäße etc., welche wir bei der Kultur der Spezies gebrauchen, voraussetzt. Die Herstellung von absoluten Reinkulturen ist aber das erste Erfordernis für Definition und Bestimmung der Spezies, da wir die Bakterien nicht nur nach Einzelindividuen bestimmen können, sondern oft gleichsam statt der Eigenschaften einer Roggenpflanze die eines ganzen Kornfeldes zur Bestimmung der Spezies benutzen. Wir müssen uns also mit diesen Methoden genau vertraut machen und bei der Anwendung derselben uns immer darüber klar sein, welchen Grad von Organismenfreiheit wir durch dieselben erhalten.

A. Absolute Sterilisation. Die Tötung aller Organismen, welche an einem Gegenstand sitzen können, gelingt zuerst sicher durch genügend hohe und lange Erwärmung der Gegenstände, wobei ganz allgemein der Effekt eine Funktion des Temperaturgrades und der Zeitdauer ist, so daß bei höherer Temperatur eine Spore im allgemeinen in kürzerer Zeit stirbt als bei niederer.

Wir sterilisieren so kleine Metallgegenstände durch direktes Erhitzen in der Bunsenflamme. Platinnadeln, Platinösen glühen wir ab und ziehen zugleich die sie tragenden Glasstäbe durch die Flamme. Pinzetten, Messer etc. lassen wir mindestens 5 Sekunden an allen Stellen von der Flamme bestreichen, ähnlich behandeln wir Objektträger.

Größere Gegenstände, welche eine trockene Erwärmung bis auf 180° und höher ertragen, wie Metall-, Glas-, Papiergegenstände, Watte etc.

sterilisieren wir im Heißluftschrank. Zur absoluten Sterilisation braucht man dabei mindestens eine Stunde bei 160° C.

Eine Abtötung aller Organismen an Gegenständen, welche nicht über 150° erhitzt werden dürfen und Wasserdampf vertragen, erreichen wir relativ schnell, wenn wir sie, bei mehr als einer Atmosphäre Druck, im Autoklaven, in gesättigtem Wasserdampf über 100° C. erhitzen. Bei 140° sterben im Autoklaven auch die widerstandsfähigsten Sporen in einer Minute ab, während sie im Wasserdampf von 100° C. erst innerhalb sechs Stunden zu Grunde gehen. Die größere Wirksamkeit der Erhitzung im Autoklaven gegenüber der Erhitzung in trockener Luft beruht darauf, daß im allgemeinen von Wasser durchtränkte Organismen von niederen Wärmegraden getötet werden als ausgetrocknete. Soll der Autoklav besser wirken als der Heißluftschrank, so müssen also die Organismen in ihm mit gesättigtem Wasserdampf oder Wasser in direkter Berührung sein.

Eine absolute Sterilisation läßt sich auch durch Einwirkung von verschiedenen Chemikalien auf die Gegenstände erreichen. Hierbei spielen im allgemeinen 1. die Konzentration der Lösung der Chemikalien, 2. die Dauer der Einwirkung, 3. die Temperatur der Lösung eine Rolle; in jedem Falle muß das Reagens das Plasma der Organismen direkt berühren können. Wir wenden auch Chemikalien in manchen Fällen an, z. B. zur Sterilisation der Hände, der Tische etc. Ein sehr energisches Gift für die Bakterien ist Sublimatlösung (1 Sublimat, 10 Kochsalz, 1000 Wasser). Milzbrandfäden werden in Lösungen von 1:500000 in wenigen Minuten, Sporen des Milzbrandes in einer Lösung 1:1000 erst in 30 Minuten getötet.

Globig (1888, S. 328) fand, daß Sporen seines roten Kartoffelbazillus nach 80 Minuten in einer Sublimatlösung 1:1000 abstarben. Dieselben Sporen starben im Dampftopfe nach ungefähr sechs Stunden ab. Kupfersulfat ist ungefähr fünfmal weniger wirksam als Sublimat (Behring 1893, S. 268).

Wir wenden zur Sterilisation von Glasgefäßen etc. manchmal rohe Salzsäure, die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt ist, oder ein Gemisch von 1 Vol. Schwefelsäure und 5 Vol. Wasser an, in welchem wir z. B. Glasgegenstände einige Zeit liegen lassen. Schon ein Zusatz von 80 ccm irgend einer Normalsäure zu einem Liter Blutserum wirkte vollständig entwickelungshemmend auf Milzbrandbakterien ein (Lingelsheim 1890, S. 202); bei welcher Konzentration und Einwirkungsdauer schon absolute Sterilisation zu erreichen ist, müßte untersucht werden. Bei längerer Einwirkung wirkt auch 70prozentiger Alkohol tötend auf alle Sporen.

B. Relative Sterilisation. Nicht in allen Fällen ist es nötig, alle Sporen, welche an einem Gegenstande sitzen, zu töten; es genügt manchmal, wenn bestimmte Spezies getötet werden. So z. B. sucht man bei der Desinfektion nur die pathogenen Bakterien, beim Pasteurisieren nur besondere, die das Verderben von Milch, Wein etc. bewirkenden Organismen, bei 70 bis 75° C. zu töten. Für uns wird es ebenso in vielen Fällen genügen, wenn wir die Nährböden so sterilisieren, daß alle in ihnen entwickelungsfähigen Sporen getötet werden. Bei einer solchen relativen Sterilisation der Nährböden liegt selbstverständlich die Gefahr vor, daß eine nachträgliche Entwickelung von Sporen eintreten kann, wenn der Nährboden

infolge des Wachstums einer aufgeimpften Spezies oder in anderer Weise verändert wird, und wir müssen immer mit dieser Möglichkeit rechnen, wenn wir nur relativ sterilisierte Nährböden benutzen. Eine solche relative Sterilisation erreicht man durch die zuerst von TYNDALL (FLÜGGE 1896, S. 437) angegebene fraktionierte oder diskontinuierliche Sterilisation. Läßt man gesättigten Wasserdampf oder Wasser von 100° auf sehr widerstandsfähige Sporen einwirken, so sterben dieselben, wie gesagt, eventuell erst nach sechs Stunden, dagegen sterben Oidien und Zellfäden der Bakterien unter diesen Umständen sehr schnell ab. Erhitzt man kleine, schnell auf 100° zu durchwärmende Gefäße mit Nährgelatine 20 Minuten, größere, die sich langsamer bis auf 100° erwärmen, bis eine Stunde im Dampftopfe, so sterben alle Oidien und Zellfäden, sowie die wenig widerstandsfähigen Sporen ab; sehr widerstandsfähige Sporen bleiben aber lebend. Wenn man letzteren dann bei gewöhnlicher Temperatur Zeit zum Keimen gibt, so werden fast alle, d. h. alle diejenigen Sporen, welche auf dem betreffenden Nährboden keimungsfähig sind, keimen, und wenn man hierauf nach einiger Zeit, z. B. nach 24 Stunden, den Nährboden sofort wieder ungefähr 20 Minuten auf 100° erwärmt, so werden die Keimstäbchen absterben, so daß jetzt weniger oder keine in diesem Nährboden entwickelungsfähigen Sporen vorhanden sein werden. Auch wenn man jedoch dieses Verfahren mehrmals wiederholt, können 1. Sporen lebend bleiben, welche bei längerem Stehen des Nährbodens auskeimen und 2. können solche Sporen, welche bei Veränderungen, die im Nährboden eintreten, auskeimen, übrig bleiben. Jedenfalls ist es nötig, daß man solche nur relativ sterile Nährböden vor der Verwendung einige Tage stehen läßt, um zu sehen, ob sie genügend frei von Keimen der ersteren Art sind. WEIL (Arch. f. Hygiene 1901, Bd. XXXIII, Hft. 3) zeigte z. B., daß in der Regel bei der Entwickelung von Milzbrandbakterien aus Sporen kein Zeitpunkt eintritt, in welchem nur vegetative Formen vorhanden sind; entweder sind noch lebende, unausgekeimte oder neugebildete Sporen in der Kultur vorhanden. Es gibt schnell Sporen bildende Spezies, welche durch diese Methode nie völlig aus einem Substrate entfernt werden können. Blutserum unterwirft man wohl nach demselben Prinzipe acht Tage lang einer fraktionierten Sterilisation bei 56° bis 60° C. (ABEL, S. 40; GÜNTHER, S. 169).

Zu den Methoden der relativen Sterilisation kann man auch noch die Filtration von Flüssigkeiten durch Chamberlandfilter (Porzellan) oder Berkfeldfilter (gebrannte Infusorienerde) mit Hülfe einer Wasserstrahlpumpe rechnen (GÜNTHER, 1898, S. 277 u. 240). Man wendet sie an, um die Stoffwechselprodukte der Bakterien, welche in die Nährflüssigkeiten ausgeschieden wurden, und welche oft gegen höhere Temperaturen empfindlich sind, von den Bakterien zu trennen (LAFAR, 1897, S. 92).

C. Reinhalten des Arbeitsraumes und Sterilisation der Tische und Hände. Der, beiläufig gesagt, am besten nach Norden gelegene Arbeitsraum muß so staubfrei wie möglich gehalten werden. Es ist für genügende Decken zum Reinigen der Schuhe vor den Türen zu sorgen, und der mit Linoleum belegte Fußboden des Raumes ist am besten täglich mit viel und zweimal gewechseltem reinen Wasser aufzuwaschen. Die mit Emaillefarbe gestrichenen Wände sind zweckmäßigerweise von Zeit zu Zeit mit einem nassen Tuche gut abzureiben.

Alle Tische und Schränke sollten möglichst so eingerichtet werden, daß sie überall glatt sind und leicht mittelst Sublimatlösung oder Spiritus überall abgewaschen werden können. Wenn es möglich ist, stellt man im eigentlichen Arbeitsraume keine Schränke zum Aufbewahren von Gegenständen auf, sondern bringt diese in einem Nebenraume unter. Vorhänge jeder Art sind möglichst zu vermeiden. Die Tischplatten der Arbeitstische und Mikroskopiertische werden am besten aus Linden- oder Ahornholz hergestellt, schwarz gebeizt und geölt.

Zum Schwarzfärben der Tischplatten stellt man sich zwei Lösungen her: 1) 600 g Anilinhydrochlorat, 4 l Wasser, 2) 86 g Kupferchlorid. 67 g Kaliumchlorat, 33 g Ammoniumchlorid, 1 l Wasser. Kurz vor dem Gebrauche mischt man 4 Vol. der Lösung 1 mit 1 Vol. der Lösung 2 und trägt die Mischung vier- bis fünfmal mit eintägigen Pausen auf das Holz mit einem Pinsel auf. Man läßt die Tische dann einige Tage im Lichte stehen und wäscht sie hierauf mit lauwarmem Wasser ab. Nach dem Trocknen reibt man die Tischplatte mittelst eines Lappens mit einem Gemisch von 1 Vol. Terpentinöl und 1 Vol. Leinölfirnis ein, bis das Holz mit Leinöl gesättigt ist. Nach einem Tage reibt man den Ueberschuß des Oeles ab (KLÖCKER, 1900, S. 17). Diese Tischplatten reinigt man eventuell von Organismen dadurch, daß man sie mit 70prozentigem Alkohol abwäscht. Man benutzt einen Schwamm, welcher in einem bedeckten Glase in dem Spiritus aufbewahrt wird.

Die auf den Tischen stehenden Reagensflaschen u. s. w. sind möglichst oft mittelst eines mit etwas Spiritus oder Wasser befeuchteten Leinenlappens abzureiben, damit sie staubfrei bleiben. Gebrauchte Objektträger und Deckgläser werfen wir in eine Schale mit Schwefelsäure (1 + 5 Wasser) oder in eine Schale mit Sublimatlösung (1 : 1000). Die Hände reinigt man mittelst einer Bürste durch Seife und warmes Wasser, wobei man besonders auf die Reinigung der Nägel zu achten hat. Man bürstet einige Minuten tüchtig und kann, wenn es nötig ist, die Hände dann mittelst eines Bausches von mit 70prozentigem Alkohol befeuchteter Baumwolle tüchtig abreiben. Nur wenn man pathogene Formen bearbeitet, läßt man noch ein Abreiben mit Sublimatlösung und nochmaligem Waschen mit Seife folgen.

D. Der Heißluftschrank oder Heißluftsterilisator. Zur Sterilisierung von größeren Metallgegenständen, Watte und ähnlichen Gegenständen, welche stärkeres, trockenes Erwärmen vertragen, aber nicht direkt durch die Flamme sterilisiert werden können, verwendet man einen Heißluftsterilisator.

Wir benutzen einen oder mehrere doppelwandige Sterilisierungsapparate aus Stahlblech mit Asbestbekleidung von folgenden inneren Maßen: Höhe 24 cm, Breite 18 cm, Tiefe 16 cm oder 30 cm Höhe, 23 cm Breite, 20 cm Tiefe, mit Pasquillenverschluß und Asbestbekleidung. Man kann den Apparat an die Wand hängen oder ein Gestell dazu mitbeziehen. Heizvorrichtung wird eventuell dazu geliefert. Derartige „Heißluftdesinfektoren“ oder „Heißluftsterilisatoren“ sind von Altmann (Fig. 2 und 3) oder von Rohrbeck (Desinfektoren-Liste 1900, No. 162), von Lautenschläger etc. zu beziehen. Es sind dazu noch einige Drahtkörbe von 18, 12, 8 cm (Fig. 1) nötig, in welche man die Reagensgläser etc. einsetzt, wenn man sie sterilisieren will.

Wir sterilisieren also in diesem Heissluftschranke Metallgegenstände (gelötete nicht), leere Glasgefäße, Watte, Fließpapier, Pappschachteln,

Holzgegenstände (nicht über 180°). Trockene Sporen widerstehen im allgemeinen einer hohen Temparatur relativ lange. KOCH und WOLFF, HUEGEL (1881) fanden, daß eine Temperatur von 140° C. drei Stunden lang auf widerstandsfähige Sporen einwirken muß, um diese zum Absterben zu bringen.

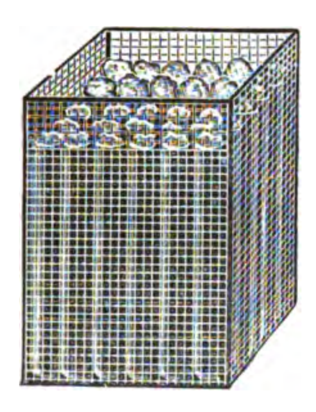


Fig. 1. Drahtkorb aus verzinkten Eisendrahtgewebe zur Aufnahme der zu sterilisierenden Reagensgläser, von Altmann.

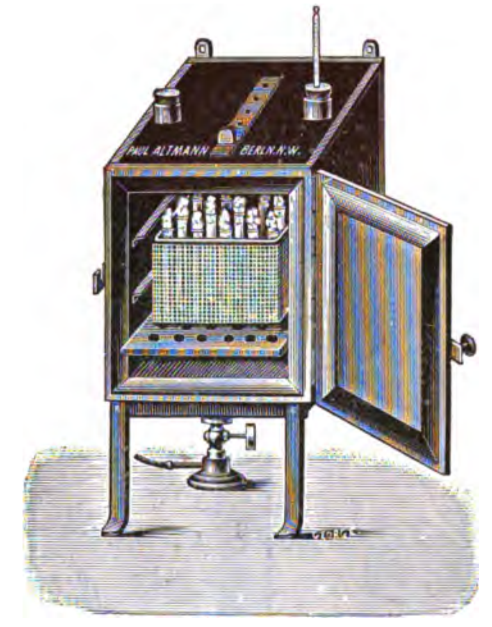


Fig. 2.

160° C. muß man zu gleichem Zwecke immer noch eine Stunde einwirken lassen (GÜNTHER, S. 33). Wir sterilisieren im allgemeinen so, daß wir die Gegenstände in den ungeheizten Schrank stellen, dessen Brenner wir ein für allemal (wir benutzen einen Teclu-Brenner mit Pilzbrenner-Aufsatz von HUGERSHOFF; Fig. 4) so eingestellt haben, dass er den Schrank gerade auf 150° bringt und erhält, wenn er angezündet wird. Wir zünden das Gas an und lassen es noch 25 Minuten brennen, wenn die Tempe-

Fig. 3.

Fig. 2 u. 3. Heißluftschrank No. 29. Liste Abt. II, 1902 von Altmann.

ratur des Schrankes 150° erreicht hat. Hierauf lassen wir die Gegenstände im Schranke stehen, bis der Schrank völlig abgekühlt ist.

E. Dampfsterilisator oder Dampftopf. Als Dampfsterilisator benutzen wir den Desinfektionsapparat B Nr. 26 von AUG. LÜMKEMANN (System BUDENBERG), welcher Apparat in jeder Beziehung zu empfehlen ist. Das Wasser (Regenwasser) wird bei diesem Apparate in das Becken *ghik* (Fig. 5) gegossen; es läuft dann durch die Oeffnungen *l* in den wenig Wasser fassenden Siederaum *abc*. Der Dampf steigt in der Doppelwand des Dampfbehälters in die Höhe, dringt durch die Löcher *d* in den Dampfbehälter und tritt bei *f* wieder aus. Der Wasserdampf, welcher spezifisch leichter ist als Luft, drückt die Luft zu dem Röhrchen *f* hinaus und erfüllt bald allein den Behälter. Das Kondenswasser fließt ebenfalls durch die Oeffnung *f* ab und gelangt so wieder in den äußeren Wasserbehälter. Der Apparat ist sehr schnell in Betrieb zu setzen, da das geringe Wasserquantum in dem Behälter *a b* sehr schnell kocht. Zum Apparat beschafft man noch einen Brenner, ein Thermometer, welches bis zu 110° reicht, und zwei oder drei runde Drahtkörbe. Von letzteren liefert LÜMKEMANN zwei Stück gratis zu dem Apparate.

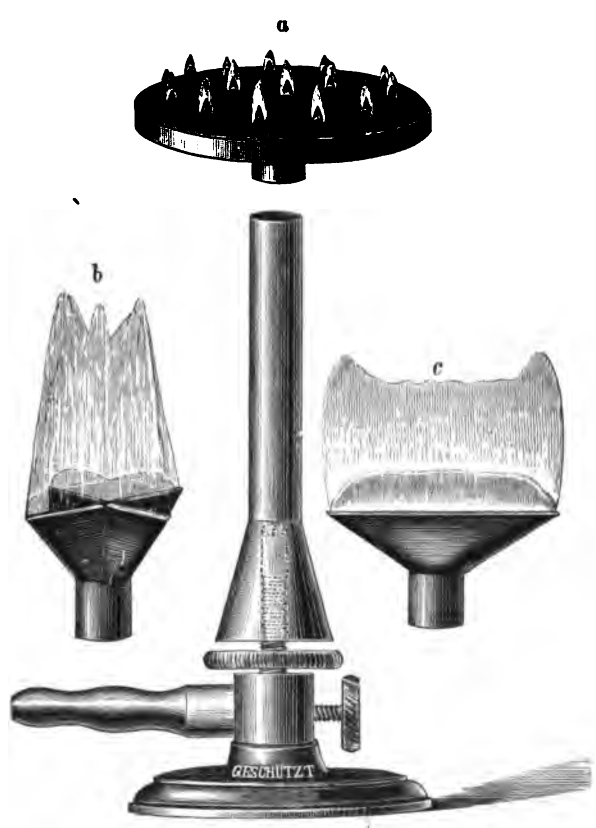


Fig. 4. Teclu-Brenner mit verschiedenen Aufsätzen; *a* Pilzbrenner-Aufsatz. Von Hugershoff.

Läßt man den Wasserdampf in diesem Apparate auf die Sporen direkt einwirken oder erhitzt man in Wasser befindliche Sporen in diesem Apparate, so sterben empfindliche Sporen schon nach einigen Minuten, sehr widerstandsfähige erst nach sechs Stunden (CLOBIG, 1887) ab. Selbstverständlich bleiben Sporen, welche, trocken und dem gesättigten Dampfe nicht zugänglich in dem Apparate erhitzt werden, dort so lange am Leben, wie in trockener, auf 100° erhitzter Luft.

F. Der Autoklav (Digestor für gespannten Dampf, Papinscher Topf). Wir benutzen einen Autoklaven von 7 Liter Inhalt, bei 200 mm lichter Weite und 250 mm Höhe, für 10 Atmosphären Maximaldruck,



No.	Grösse d. nutzb. Raumes			Preis
	Durchm. mm	Höhe mm	Inhalt Liter	Mk.
24	205	150	5	33
25	206	280	10	35
26	240	350	16	45
27	250	427	21	60

Es kosten ausserdem:

1	Untersatz	Mk.	3,—
1	Thermometer . . .	„	3,—
1	Spiritusbrenner . .	„	12,—
1	Bunsen-Gasbrenner .	„	6,—

Verpackung wird besonders berechnet.

Fig. 5. Dampftopf, System Budenberg (Desinfektions-Apparat B von Lümkemann).

mit kupfernem Kessel, kupfernem Drahteinsatz, Sicherheitsventil, Manometerregulator, Vorrichtung zum Einsetzen eines Thermometers. Dazu ein Gasbrenner und ein Thermometer von 0° bis 250°. Der Apparat kann z. B. bezogen werden von ALTMANN (1902, Abth. II, Nr. 25), ROHRBECK (1890, Nr. 68), GUSTAV CHRIST & Co. Man stellt auch jetzt Autoklaven für niederern Druck her, die nur für bakteriologische Arbeiten bestimmt sind.

Ein wichtiger Teil des Apparates ist der Manometerregulator (Fig. 7 a, b, c). Dieser Apparat besteht aus einem Manometer, welches auf seinem Zifferblatte den Dampfdruck direkt anzeigt. An einer Nebenskala findet man die Temperatur des gesättigten Dampfes bei dem angezeigten Drucke verzeichnet. Ausser dem Zeiger des Manometers, welcher den Dampfdruck anzeigt,

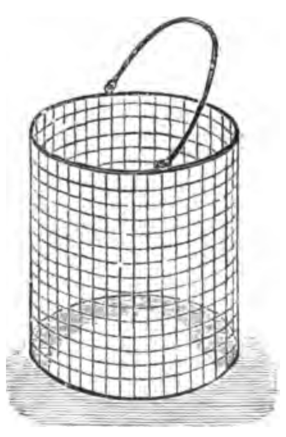
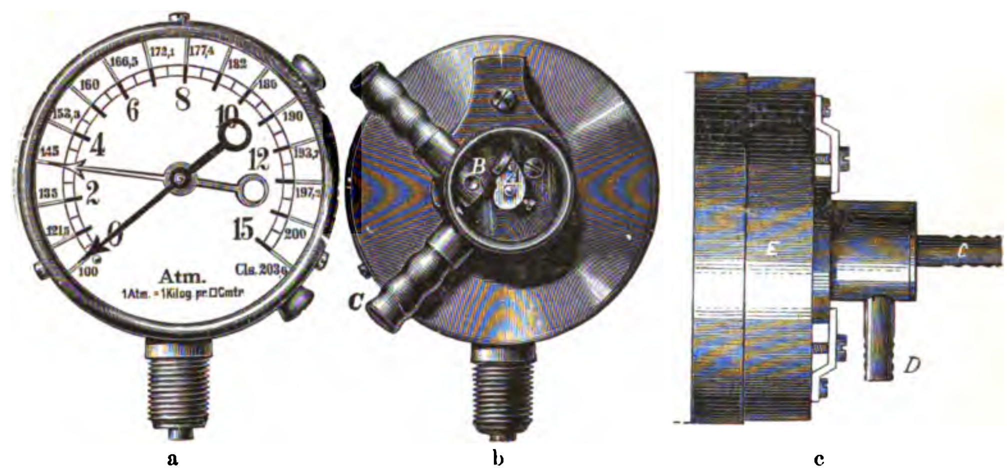


Fig. 6.
Drahtkorb aus verzinntem Eisendrahtgewebe, mit Henkel; No. 149 der Liste Abt. II, 1902 von Altmann.

findet sich noch ein Zeiger, mittelst dessen man den Antoklaven auf bestimmten, konstanten Druck einstellen kann.

An dem der Skala abgekehrten Teile des Regulators ist eine runde Büchse angebracht, in welche das Gas durch ein mit ihr fest verbundenes Rohr einströmt, um von da aus durch ein Seitenrohr zum Brenner zu gelangen. Die Büchse ist um eine Achse drehbar, welche über die Achse des Manometerzeigers übergestülpt ist und beim Drehen einen Zeiger vor der Manometerskala mitnimmt. Die letztere Achse ist in die Büchse verlängert und endigt in ein excentrisch sitzendes abgeschrägtes Metallstück mit einer Metallplatte (*A*, Fig. 7 b). Beim Drehen des Manometerzeigers legt sich diese Metallplatte gegen die ebenfalls excentrisch in die Büchse hineinragende und abgeschrägte Gaszuführungs-



a b c

Fig. 7. Manometerregulator (aus den Katalogen von Altmann und von Lautenschläger).

röhre (*B*), welche dadurch geschlossen wird. Durch Drehen der Büchse wird also die Gaseinströmungsöffnung kreisförmig verschoben. Je weiter man durch Drehen der Büchse den einen auf der Achse befestigten, meist rot gefärbten Zeiger aus der Null-Lage entfernt, um so grösser ist auch der Weg, den der Manometerzeiger zurücklegen muß, ehe das daran sitzende Metallplättchen die Gaseinströmungsöffnung verschließt; ein um so größerer Dampfdruck, mithin also auch eine um so höhere Temperatur ist daher bis zum Schließen der Gaszuleitung erforderlich. Sinkt der Druck, also auch die Temperatur, so geht der Manometerzeiger zurück, das Metallblättchen öffnet wieder die Gaszuleitung und die Flamme kann den Apparat von neuem erhitzen. Damit beim Schließen der Zuleitung die Flamme nicht erlischt, ist eine feine Reserveöffnung an der Zuleitungsröhre in der Büchse wie bei den Thermoregulatoren vorhanden, groß genug, um eine Notflamme (Zündflamme) zu unterhalten.

Wir können also durch Drehen der Büchse und damit des einen (roten) Zeigers das Manometer so einstellen, daß in dem Autoklaven jede beliebige Temperatur von 100° bis 170° entsteht. Wir stellen für unseren Zweck jetzt also den Zeiger so, daß er auf 1,4 Atmosphären (ungefähr 125°) gestellt ist. Wir müssen darauf achten. dass beim Arbeiten mit dem Apparat keine Veränderung dieser Zeigerstellung eintritt.

Vorschriften für das Arbeiten mit dem Apparate.

Wir füllen zuerst ungefähr 500 ccm destilliertes Wasser in den Autoklaven (Fig. 8), wenn er leer ist, überzeugen uns stets, daß so viel Wasser im Apparat ist, wenn noch Wasser darin sein sollte.



Fig. 8. Autoklav.

Hierauf stellen wir die zu sterilisierenden Gegenstände in den Drahtkorb und setzen den Deckel des Autoklaven vorsichtig auf, so daß die Zahlen oder Marken, wenn solche vorhanden, sich gegenüber stehen, und ohne daß wir die Bleidichtung verletzen. Wir schieben den Bügel über, ziehen dessen Schraube (*k*) mit dem Schraubenschlüssel lose an und öffnen den Ablaßhahn (*c*). Der Regulator (*d*) ist durch

das nicht schräg abgeschnittene Rohr (Fig. 7, *b, C.*) mit dem Gashahn, durch das andere (das innen schräg abgeschnittene) mit dem Brenner verbunden. Wir überzeugen uns, daß der rote Zeiger des Apparates richtig auf 125° (1,4 Atmosphären) eingestellt ist. Wir öffnen den Gashahn und zünden die Flamme an, welche in der Mitte unter dem Apparat zu stehen hat. Nach ungefähr 15 Minuten wird der Dampf aus dem Dampfhahne kräftig ausströmen, welchen man durch ein Kautschukrohr in ein Gefäß mit kaltem Wasser einleiten kann. Wir lassen den Dampf mehrere Minuten ausströmen, um alle Luft aus dem Kessel auszutreiben und schließen dann den Deckel durch die Schraube (*k*) und den Hahn durch die betreffende Schraube (*c*) fest, so daß keine Spur von Dampf mehr ausströmt, ohne dabei das Anschrauben zu übertreiben. Wir lassen den Apparat, nachdem das Manometer seinen höchsten Stand erreicht hat, noch 12 Minuten geschlossen. Hiernach drehen wir die Flamme etwas kleiner, öffnen den Dampfhahn und schließen dann, wenn das Manometer auf den halben Druck gesunken ist, den Gashahn. Es strömt dabei viel Dampf aus, den man in den Abzug leiten kann. Haben wir offene Gefäße im Apparat, so thun wir gut, eine längere Röhre mit steriler Watte vorzulegen, so daß die zurückströmende Luft durch diese filtriert wird.

Nach dem völligen Erkalten des Apparates öffnen wir den Bügel des Apparates, um die Gegenstände herauszunehmen.

Bei Arbeiten mit dem Autoklaven haben wir sonach folgendes zu berücksichtigen. Die Temperatur des Dampfes und der Dampfdruck stehen nur so lange in der auf den beiden Skalen des Manometers angegebenen Beziehung, so lange der Wasserdampf gesättigt ist, und so lange der Dampfraum luftfrei ist. Entsteht im Autoklaven überhitzter Dampf, so sind die Angaben des Manometerzeigers über die Temperatur zu niedrig. Ist noch Luft im Dampfraume, so ist die Angabe des Manometerzeigers über die Temperatur zu hoch.

Man kontrolliert die Richtigkeit des Zustandes des Autoklaven durch Vergleichung des Standes eines in das Röhrchen im Autoklaven gesteckten Thermometers und der Druckangabe des Manometers.

Bei einer Temperatur von	104,4	108,7	112,7	116,2	120,1	133,2	Grad Celsius
muss der Dampfdruck sein:	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	Atmosphären.

Zeigt also das Manometer bei der beobachteten Temperatur einen niedrigeren Druck an, so befindet sich im Apparate überhitzter Dampf, zeigt das Manometer einen höheren Druck, so befindet sich noch Luft im Apparate.

Ungesättigter, überhitzter Wasserdampf kann entstehen, wenn man eine Stelle der Wand des Autoklaven durch die Flamme zu stark erhitzt, oder wenn die Wassermenge im Kessel eine äußerst geringe ist, so daß das Wasser ganz verdampft. Der überhitzte Wasserdampf wirkt annähernd wie trockene Luft auf die trockenen Sporen ein (Esmarch, 1888), tötet also erst bei viel höherer Temperatur als der gesättigte Dampf. Wie der gesättigte Wasserdampf wirkt selbstverständlich auch das unter Druck stehende Wasser von der Temperatur des Wasserdampfes im Autoklaven. Sporen, welche trocken sind und nicht mit dem gesättigten Wasserdampf oder mit Wasser in Berührung kommen, sterben also im Autoklaven nicht eher als in trockener Luft von der Temperatur des Dampfes des Autoklaven. Zu beachten ist, dass Gelatine bei 120° im Autoklaven schon von ihrem Erstarrungsvermögen einbüßt, und daß Milch bei 130° gebräunt wird.

Nach CHRISTEN (Mitteilungen aus den Kliniken und medizinischen Instituten der Schweiz 1895 III. Reihe, Heft 12,) sterben die resistentesten Sporen aus Erde im Autoklaven

bei 105—110° in 2—4 Stunden,
„ 115° „ 30—60 Minuten,
„ 120° „ 5—15 „
„ 125—130° „ 5 „
„ 140° „ 1 Minute.

Für seinen roten Kartoffelbazillus fand GLOBIG (1888) folgendes. Die Sporen starben im Dampf

bei 100° nach $5^1/_2$—6 Stunden,
„ 109—113° noch nicht nach $^3/_4$ Stunden,
„ 113—116° nach 25 Minuten,
„ 122—123° „ 10 „
„ 126° „ 3 „
„ 127° „ 2 „
„ 130° sofort.

Zur absoluten Sterilisaation wird ein 20 Minuten langes Erhitzen auf 120°, ein 10 Minuten langes auf 125° ausreichen.

Wir sterilisieren vorteilhafterweise im Autoklaven durch 12 Minuten langes Erhitzen auf 125°. Destilliertes Wasser, Nähragar, auch feste Nährböden, die aus dem Pflanzenreich stammen etc., können im Autoklaven absolut sterilisiert werden.

Uebung I.

Sterilisation von Reagensgläsern und Petrischalen im Heissluftschrank.

A. Wir reinigen 50 Reagensgläser von 15 cm Länge und 15 mm lichter Weite sauber mit Wasser und Reagensglasbürste und stellen sie umgekehrt in einen Drahtkorb, lassen sie auslaufen und trocken werden und schließen sie dann mit Baumwolle. Wir benutzen dazu langfaserige, rohe Baumwolle, bilden daraus einen Bausch, dessen Fasern möglichst glatt liegen und drehen denselben möglichst fest in den Hals des Reagensrohres ein, da er sich beim Sterilisieren etwas lockern wird. Wir stellen je 25 der geschlossenen Gläser, die Baumwolle nach oben,

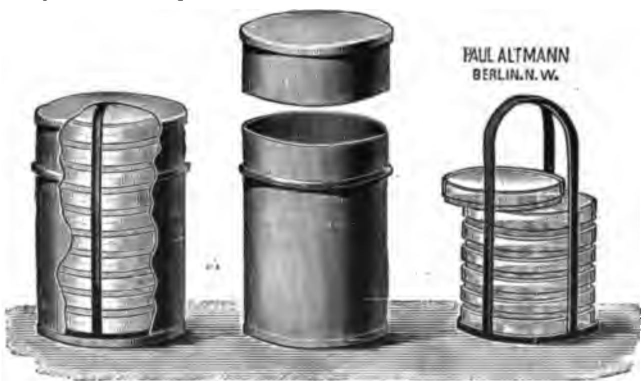


Fig. 9. Aufbewahrungsgefäss für sterilisierte Petri'sche Doppelschalen. Die Schalen werden mit dem Gestell in der Blechbüchse im Heißluftkasten sterilisiert und darin bis zum Gebrauch belassen. Beim Sterilisieren wird der Deckel so gedreht, dass das Loch in demselben mit dem Loch im Büchsenrand sich deckt, es kann dann die heiße Luft zirkulieren. Nach dem Sterilisieren versschließt man durch einfache Drehung. Zur Aufnahme von 12 Doppelschalen, aus Messing, 6 Mk.

in einen Drahtkorb (Fig. 1) ein und stellen sie in den ungeheizten Heißluftschrank. Wir zünden den, wie früher mitgeteilt, eingestellten Brenner an, sehen von Zeit zu Zeit nach, ob die Temperatur des Schrankes bis auf 150° C. gestiegen ist und lassen die Gefäße danach noch 25 Minuten bei 150° im Schranke. Wir drehen hierauf das Gas aus und lassen die Gefäße im Schranke kalt werden. Die sterilen Gläser werden dann in ein größeres Glas gestellt, auf dessen Boden etwas Baumwolle liegt, und aufbewahrt.

B. Wir reinigen uns 12 Petrischalen von 14 mm Höhe und 10 cm Breite (von Altmann oder Lautenschläger etc. bezogen), lassen sie trocknen und sterilisieren sie im Heißluftschranke. Wir stellen sie nach dem Abkühlen auf einen reinen Porzellanteller und bedecken sie mit einer Glasglocke. Sehr bequem ist die Anwendung eines Aufbewahrungsgefäßes für die Petrischalen, dessen Beschreibung und Abbildung (Fig. 9) auf Seite 13 zu finden ist.

Kapitel II.

Die Nährböden für die Bakterien und Pilze.

Litteratur.

Abel, *1900.* — ***F. Czapek,*** *Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Schimmelpilze; Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathologie; Zeitschrift für Biochemie, 1902, I, S. 538; II, 557, III, S. 47.* — ***Fränkel,*** *Beiträge zur Kenntnis des Bakterienwachstums auf eiweissfreien Nährböden; Hygienische Rundschau, 1894, Bd. IV, S. 769.* — ***Bruhne,*** *Hormodendron Hordei, Ein Beitrag zur Kenntnis der Gerstenkrankheiten; Zopf's Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen, Leipzig 1894, 4. Heft.* — ***Büri,*** *Ueber einige zum Zwecke der Artcharakterisierung anzuwendende bakteriol. Untersuchungsmethoden etc.; Archiv für Hygiene, 1893, Bd. XIX, S. 11.* -- ***Heim,*** *1894.* — ***Klöcker,*** *1900.* — ***König,*** *Die menschlichen Nahrungs- und Genussmittel, II. T., Berlin, Springer, 1893.* — ***Hesse und Niedner,*** *Die Methodik der bakteriologischen Wasseruntersuchung; Zeitschrift für Hygiene Bd. XXXIX, 1898, S. 454.* — ***Maasen,*** *Beiträge zur Differenzierung einiger dem Vibrio der asiatischen Cholera verwandten Vibrionen und kurze Angaben über eiweissfreie Nährböden von allgemeiner Anwendbarkeit; Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, 1894, S. 401.* — ***Migula,*** *1897, Bd. I., S. 246.* — ***Nägeli,*** *Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen; Untersuchungen über niedere Pilze, 1882.* — ***Omeliansky,*** *Ueber die Isolierung der Nitrifikationsmikroben aus dem Erdboden; Centralblatt für Bakteriologie, II. Abt., 1899, Bd. V., Nr. 15, S. 537.* — ***Omeliansky,*** *Magnesia-Gipsplatten als neues festes Substrat für die Kultur der Nitrifikationsorganismen; Centralblatt für Bakteriologie 1899, II. Abt., Bd. V., No. 18/19, S. 652.* — ***A. Stutzer,*** *Die Organismen der Nitrifikation; Centralblatt für Bakteriologie, II. Abt., Bd VII., 1901, No. 5/6, S. 168.* — ***Zettnow,*** *Nährboden für Spirillum undula majus; Centralblatt für Bakteriologie, 1896, Bd. XIX, S. 393.*

A. Die Lösung mineralischer Nährstoffe.

Außer C, H, N, O brauchen die Pilze und wahrscheinlich auch viele Bakterien nur K, Mg, Fe, P, S (Molisch, Bot. Centralblatt 1894, Bd. LX, S. 167; Benecke, Jahrb. f. wiss. Bot. 1895, S. 487; Bot. Zeit. 1896, S. 97) zu ihrem Leben, die von ihnen mindestens in sehr vielen Fällen in Form anorganischer Salze aufgenommen werden können. Die Frage, ob Ca und Na allen Bakterien und Pilzen völlig entbehrlich sei, scheint mir noch nicht entschieden zu sein. Bezüglich des Ca zeigen die Erfahrungen, welche an Algen gemacht sind, daß verschiedene Spezies einer Pflanzengruppe teilweise ohne Ca auskommen können, teilweise nicht.

Die zuletzt genannten Elemente bleiben in der Asche der Pflanzen zurück. Bei höheren Pilzen beträgt der Aschengehalt, auf Frischgewicht berechnet, ungefähr 1 % (König, S. 747 u. f.).

Strohmer fand bei Boletus edulis, berechnet auf Trockensubstanz: im Hute 8,3, im Stiel 1,9, im ganzen Pilze 6,4 % Asche. In der Hefenasche fand Mitscherlich (Flügge, 1896, I, S. 96): Kali 38,8, Phosphorsäure 53,9, Kalk 1,0, Magnesia 6,0 %. Kappes (Analyse der Massenkulturen einiger Spaltpilze etc., Diss., Leipzig 1890) fand in der Trockensubstanz des Bac. prodigiosus, welcher 85 % Wasser enthielt: Asche 13,5, Kali 1,5, Natron 3,9, Kalk 0,56, Magnesia 1,05, Phosphorsäure 5,12, Chlor 0,66, Kieselsäure 0,07 %. Cramer (Archiv f. Hygiene Bd. XIII, S. 78—84) fand unter verschiedenen Ernährungsbedingungen folgenden Aschengehalt in der Trockensubstanz von Bac. prodigiosus: 9,3, 12,5, 11,4, 13,8, 12,8, 9,8, im Durchschnitt also 11,6 %.

Am besten bietet man die genannten Elemente in mineralischen Nährlösungen in Form höherer Oxyde. Pilze sollen nach Nägeli (Bot. Mitteilungen 1881, Bd. III, S. 459) den Schwefel aus Sulfiten und Hyposulfiten entnehmen können, die Schwefelbakterien verarbeiten Schwefelwasserstoff und viele Gasbildner greifen das Element direkt an, daraus Merkaptane oder Schwefelwasserstoff bildend.

Bemerkt mag noch werden, daß manche anorganische Stoffe (Gifte) unter Umständen in sehr kleinen Dosen anregend auf das Wachstum der Pilze einwirken können, so Zn, Cu, Co, Mn, Li, Fe (Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Bot. 1895, S. 238; Richards, ebenda 1897, S. 665; Richter, Centralbl. f. Bakt. Bd. VII., 1901, 2. Abt., S. 417).

Da die Pilze und Bakterien die Nährstoffe aus dem verdünntesten Lösungen, selbst aus solchen, in denen sie direkt chemisch nicht nachweisbar sind, aufnehmen können, so kommt es auf die Konzentration der mineralischen Nährlösung nicht sehr genau an. Man thut gut, sie nicht zu konzentriert zu verwenden.

Man kann, wenn man stickstoffhaltige mineralische Nährlösung für Bakterienkultur benutzen will, die Nährlösung nach Knop verwenden.

I. KNOP-Nährlösung.

1. 20,5 g $MgSO^4 + 7H^2O$ zu 350 ccm gelöst.
2. 40 g CaN^2O^6 + 10 g KNO^3, 10 g H^2KPO^4 zu 350 g gelöst.

Von 1 und 2 je 100 ccm zu 9,8 l Wasser gegeben bilden eine 0,2 prozentige Lösung der wasserfreien Salze.

Wir verwenden, wenn stickstofffreie mineralische Nährlösung zu benutzen ist, die folgende Lösung:

II. Stickstofffreie mineralische Nährlösung (M-Nährlösung).

1 g KH^2PO^4, 0,1 g $CaCl^2$, 0,3 g $MgSO^4 + 7H^2O$, 0,1 g NaCl, 0,01 g Fe^2Cl^6, 1000 g Wasser.

Aehnlich ist die stickstofffreie Lösung nach Winogradsky zusammengesetzt.

III. Mineralische Nährlösung nach WINOGRADSKY.

1 g K^2HPO^4, 0,2 g $MgSO^4 + 7H^2O$, 0,02 g NaCl, 0,01 $FeSO^4 + 7H^2O$, 0,01 $SO^4Mn + 4H^2O$.

B. Einige Rohstoffe, die zur Bereitung der Nährsubstrate dienen.

Liebigs Fleischextrakt. (König 1893, II. T., S. 169.) Fleischextrakt wird hergestellt, indem man mageres Fleisch mit der 8- bis 10fachen Menge von Wasser auskocht, Eiweiß und Fett entfernt und die Lösung zur Extraktkonsistenz eindampft. 30 kg Fleisch liefern ungefähr 1 kg Fleischextrakt. Das Extrakt enthält 23 % Wasser, 17 % Salze, 60 % organische Substanz. Die Salze enthalten ungefähr 42 % Kali, 13 % Natron, 0,5 % Kalk, 3 % Magnesia, 0,3 % Eisenoxyd, 30 % Phosphorsäure, 2 % Schwefelsäure, 10 % Chlor. Die organische Substanz enthält hauptsächlich Kreatin (3,5 %), Kreatinin, Sarkin, Xanthin, Inosinsäure, Carnin (1 %), Leim (10 %), Fleischmilchsäure. Reaktion schwach sauer. Wir lösen das Fleischextrakt, welches wir beziehen, sogleich in der gleichen Gewichtsmenge Wasser auf und füllen es in kleine Kölbchen, die wir mit einem sterilen Wattebausch verschließen. Wir sterilisieren die Kölbchen an drei aufeinander folgenden Tagen 20 Minuten im Dampftopfe oder besser einmal 15 Minuten im Autoklaven bei 125°. So sind wir sicher, immer gleichartiges Material zu verwenden, was sonst nicht der Fall wäre, da das Fleischextrakt in den Büchsen immer einen Bodensatz bildet. Wir gehen also auch stets von sterilem Fleischextrakt aus. 2 Gewichtsteile unserer Lösung sind gleich 1 Gewichtsteil Fleischextrakt.

Pepton. Die Handelspeptone sind sehr verschiedenartige Körper. Sie werden z. B. durch Verdauung von Caseïn mittelst Pankreatin (Trypsin) oder mittelst Pankreatin aus Fleisch oder durch Einwirkung überhitzten Wasserdampfs auf Eiweißkörper gewonnen.

Wir benutzen ausschließlich das Pepton von Friedrich Witte in Rostock in Meckl. Das Witte'sche Pepton reagiert alkalisch. Die Peptone enthalten ungefähr 5 bis 10 % Salze.

Gelatine. Die Gelatine ist aus Knochen hergestellter, mit schwefliger Säure gebleichter Leim. Sie besteht aus Glutin ungefähr von der elementaren Zusammensetzung: 49 C, 7 H, 18 N, 0,3 S, 26 O. Die verschiedenen Gelatinen des Handels sind in ihren Eigenschaften sehr verschieden. Vorzüglich ist das Erstarrungsvermögen der aus ihnen hergestellten Gallerten verschieden. In der kälteren Jahreszeit (bis + 20° C.) bleibt eine Gelatinegallerte mit 5 % Gelatine gewöhnlich fest. Bei einer Temperatur von 24° muß man gewöhnlich mehr als 10 % Gelatine für die Gallerte verwenden (Migula 1897). Der Säuregehalt der Gelatine wechselt sehr. Zur Neutralisation von 100 g gebraucht man ungefähr 20 bis 40 ccm $^1/_{10}$ Normallauge. Manche Gelatinen enthalten etwas Nitrate, andere nicht. Manche Gelatinen enthalten sehr widerstandsfähige Sporen, andere nicht. Wir beziehen die beste französische Gelatine, von gutem Erstarrungsvermögen. Merck liefert gute Gelatine (Gelatine extrafein Golddruck), ebenso Grübler.

Agar-Agar. Agar wird aus verschiedenen Florideen aus der Gattung Gelidium, Gigartina, Gracillaria etc. hergestellt. Er enthält wesentlich ein Kohlehydrat (Gelose oder δ-Galactan; Tollens 1888, S. 210) $C^6H^{10}O^5$. Aus den Inversionsprodukten des Kohlehydrates ist Galaktose isoliert worden. Agar enthält ungefähr 20 % Wasser, 74 % Kohlehydrate, 4 % Aschenbestandteile, 2 % stickstoffhaltige Substanz (König, 1893, S. 670). Agar ist von neutraler Reaktion. Guten Agar-Agar liefern Caesar und Loretz, Drogenhandlung, Halle a. S., Grübler, Merck. $1^1/_2$ bis 2 g Agar mit 100 ccm Wasser gekocht, liefert schon

eine noch bei 28° C. relativ feste Gallerte. Für 60° C. muss man 3 g Agar auf 100 ccm Wasser anwenden. In neutraler Lösung verändert sich der Agar beim Kochen nicht. Setzt man der kochenden Agarlösung nur Spuren von Säure zu, so wird das Erstarrungsvermögen der Lösung vermindert, bei langem Kochen oder stärkerem Säurezusatz selbst völlig aufgehoben.

Bierwürzeextrakt. Man bezieht ungehopfte, helle Würze (Malzwürze) aus einer Brauerei, dampft dieselbe in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade, unter Umrühren, zu dünnem Syrup ein, füllt mit diesem sterile 100 ccm-Kölbchen, verschliesst sie mit steriler Baumwolle oder mit doppeltem, sterilen Fließpapier und Staniol, um welches man ein Gummiband legt und sterilisiert das Extrakt wie das Fleischextrakt.

Man dampft 30 ccm des Extraktes in einem gewogenen Porzellanschälchen ab, trocknet bei 100° völlig ein und wiegt den Trockenrückstand. Den Prozentgehalt des Extraktes an Trockensubstanz notiert man auf der Etikette des Kölbchens. Die Würzen der Brauereien haben einen Extraktgehalt von 10 - 15 %.

Konzentrierter Traubenmost kann bezogen werden von der Firma Favara & Figli, Mazzare de Vallo, Sizilien. 4 Teile Traubenmost sind auf 1 Teil Extrakt eingedickt. Zur Herstellung von Most müssen 100 g davon in 300 g Wasser gelöst, filtriert und sterilisiert werden. 100 ccm Traubenmost enthalten ungefähr in Grammen: 70—80 Wasser, 12 - 18 Zucker (Dextrose und Lävulose), 0,1—0,8 organische Säuren (vorzüglich Weinsäure und Äpfelsäure), Stickstoffsubstanzen 0,2—0,4, Mineralstoffe 0,25—0,5 (Magnesia 0,014, Kalk 0,015, Kali 0,15, Schwefelsäure 0,01, Phosphorsäure 0,04, Eisenoxyd, Chlor, Natron).

Nährstoff Heyden. Besteht wesentlich aus Albumosen. Er ist ein nicht hygroskopisches Pulver, welches sich mit wenig heißem Wasser zu einem Breie anrühren läßt und sich löst, wenn man es nach weiterem Wasserzusatz 5 Minuten lang kocht. Hergestellt in der Fabrik von Heyden, Radebeul-Dresden; 250 g M. 10,50.

C. Anorganische Nährböden und Nährlösungen für Nitritbakterien und Nitratbakterien.

Die Bakterienspezies, welche den Kohlenstoff aus der freien Kohlensäure assimilieren können, unter Benutzung der durch Oxydation von Ammoniak zu Nitriten, oder Nitriten zu Nitraten, frei werdenden Energie, die Nitritbakterien und Nitratbakterien, können auf vollkommen anorganischen Nährsubstraten wachsen. Unsere Kenntnisse über diese Bakterien verdanken wir hauptsächlich Winogradsky (1889—1891, Annales de l'Institut Pasteur IV, V; Archives de sciences biolog. publ. par l'Instit. impérial de méd. expér. à St. Petersbourg, 1892, I; Centralbl. f. Bakt., 1896, 2. Abt., II).

Omeliansky (1899, S. 537 u. 652) machte genaue Angaben über die Kulturmethoden, die in Winogradsky's Laboratorium benutzt wurden, denen wir hier zuerst folgen. Sonst sind noch die Angaben von Frankland, Beijerinck, Kühne (Zeitschrift f. Biolog. 1890, Bd. XXVII, Heft 1), Sleskin (Centralbl. f. Bakt. 1891, Bd. X, S. 201) zu beachten.

Nitritbakterien.

(Bakterien, die aus NH^3 NO^2H bilden.)

Nährlösung zum Fangen der Nitritbakterien.

2 g Ammoniumsulfat, 2 g Natriumchlorid, 1 g Kaliumphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Ferrosulfat, 1000 g Wasser.

Um mittelst dieser Nährlösung angereichertes Impfmaterial zu gewinnen, werden flache Kölbchen von 12 cm Durchmesser benutzt, die mit 50 ccm der Nährlösung und 0,5 g Magnesiumkarbonat beschickt sind und mit Erde direkt geimpft werden. Eventuell wird später noch 1 ccm einer 10proz. Ammoniumsulfatlösung nachgegeben. Es wird drei- bis viermal umgeimpft.

Nähr-Kieselgallerte

zur Isolierung der Nitritbakterien.

Kieselsäurelösung. Ein Volumen reines und klares Kali- oder Natronwasserglas (spez. Gew. 1,05—1,06) und ein Volumen Salzsäure (spez. Gew. 1,10), allmählich hinzugefügt, und bis zum Verschwinden der Chlorreaktion in völlig dichten Pergamentschläuchen (ungefähr 1 Tag lang gegen fließendes und 1 Tag lang gegen destilliertes Wasser) dialysiert. Das Produkt wird die kurze Zeit, die vor seinem Gebrauche vergeht, in Glasstöpselgläsern aufbewahrt. Bei 115—120° C. wird die Lösung sterilisiert.

Lösung 1. Kal. phosph. 1 g, Amm. sulf. 3 g, Magn. sulf. 0,5 g, Aq. dest. 1000 ccm.

Lösung 2. Ferrum sulf. 2 g, Aq. dest. 100 g.

Lösung 3. Gesättigte Lösung von Chlornatrium.

Flüssigkeit 4. Aufschwemmung von Magnesiumkarbonat, welches durch ein feines Sieb getrieben worden war.

50 ccm Kieselsäure werden mit 2,5 ccm der Lösung 1 und 1 ccm der Lösung 2, einer Oese voll der Lösung 3 und mit Flüssigkeit 4 bis zur milchigen Trübung versetzt — und mit einer Oese des Impfmaterials. Dann schüttelt man die Mischung und gießt in die Petrischale aus.

An zwei gegenüberliegenden Stellen des Randes der Schale werden von der Gallertschicht kleine Segmente weggeschnitten und in die so gebildeten Vertiefungen werden, so oft es nötig ist, je 2 Tropfen einer 10proz. Ammoniumsulfatlösung hineingegossen. Es löst sich bald die Magnesia in der Umgebung der Kolonien auf.

Zur Weiterzucht der abgeimpften Kolonien werden 10 ccm haltende, konische Gefäße benutzt, welche mit der mit Magnesia versetzten Nährlösung zum Fangen der Nitritbakterien beschickt sind, zur Weiterzucht reiner Bakterien Reagensgläser mit schiefer Nährkieselgallerte.

Nähr-Gipsplatten für Nitritbakterien.

100 g Gips, 1 g Magnesiumkarbonat mit Wasser zur Konsistenz von saurem Rahm angerührt, auf eine Spiegelglasplatte ausgegossen. Daraus werden Platten von der Größe kleiner Petrischalen (eventuell Streifen für Reagensgläser) ausgeschnitten. Die Platten werden in Petrischalen, mit der blanken Fläche nach oben, gebracht, und in die Schalen wird so viel von der „Nährlösung zum Fangen der Nitritbakterien“ eingegossen, daß das Niveau der Flüssigkeit die halbe Höhe der Platten erreicht. Die Platten werden dann in einem Autoklaven bei 120° sterilisiert. Werden die Platten trocken, so gießt man wieder etwas Nährlösung in die Schale neben die Platten. Zum Impfen breitet man einen Tropfen der verdünnten, flüssigen Kultur auf der Oberfläche der Platten aus. Man hält die Platten bei 25—30°. Nach 5 Tagen erscheinen die Kolonien in Tröpfchenform. Man sollte versuchen, etwas von den Kulturen dem sterilisierten Materiale vor dem Gießen zuzusetzen und dann auszugießen.

BEIJERINCK's Agar für nitritbildende Bakterien (Centralblatt für Bakteriologie 1896, Bd. XIX, S. 258) soll nach OMELIANSKY weniger gut sein, doch würde er vielleicht mit WINOGRADSKY's mineralischer Nährlösung besser werden.

Nährlösung für Nitritbakterien nach STUTZER (1901).

10 g Magnesiumkarbonat, 10 g trockene phosphorsaure Ammoniakmagnesia, gemischt, einen halben Theelöffel davon in einen Kolben mit 50 ccm einer Lösung von: 1 g Bikaliumphosphat, 0,25 g Natriumchlorid, 0,25 g Ferrosulfat in 1 Liter Wasser, gegeben und das Ganze sterilisiert.

Nähragar für Nitritbakterien nach STUTZER (1901).

In ziemlich weite Reagensgläser wird je ein halber Theelöffel voll von einer Mischung gleicher Teile phosphorsaurer Ammoniakmagnesia und Magnesiumkarbonat eingeschüttet und 10—15 ccm einer geschmolzenen Agarlösung hinzugefügt, welche in 1 Liter enthält: 10 g Agar, 1 g Bikaliumphosphat, 0,5 g Chlornatrium, 0,5 g Ferrosulfat. Sterilisiert. Für Strichkulturen läßt man die dickflüssige Masse bis auf 40° im Wasserbade erkalten, schüttelt nun die Flüssigkeit gut um und läßt die Gläser in geeigneter Lage in Eiswasser schnell erkalten, um die unlöslichen Körper in dem Nährboden suspendiert zu halten.

Nitratbakterien.

(Bakterien, die aus Nitriten Nitrate erzeugen.)

Nährlösung zum Fangen von Nitratbakterien.

Natr. nitros. (MERCK) 1 g, Natr. carbon. (ustum) 1 g, Kal. phosphoric. 0,5 g, Natr. chlor. 0,5 g, Ferr. sulf. 0,4 g, Magnes. sulf. 0,3 g, Aq. dest. 1000 g.

Nähragar zur Isolierung der Nitratbakterien. (Siehe auch WINOGRADSKY, Centralbl. f. Bakteriol. 1896, Bd. II, S. 425).

Natr. nitros. 2 g, Natr. carbon. ustum 1 g, Kal. phosph. 0,01 g, Agar 15 g, Wasser aus der Wasserleitung 1000 g.

Nähragar für Nitratbakterien nach STUTZER (1901).

2 g Natriumnitrit, 1 g Bikaliumphosphat, 0,3 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Natriumchlorid, 0,5 g Kaliumkarbonat, 1000 g Wasser, 15 g Agar.

D. Künstliche Nährsubstrate, welche organische Verbindungen enthalten und Allgemeines über das Wachstum der Bakterien in verschiedenen Nährlösungen.

Die allermeisten Bakterien und Pilze vermögen den Kohlenstoff nur aus organischen Verbindungen zu assimilieren, den Stickstoff nur aus seinen Verbindungen zu entnehmen. In letzterer Beziehung machen nur die sogenannten Stickstoffbakterien (Clostridium Pasteurianum Winogradsky) eine Ausnahme, welche freien Stickstoff zu assimilieren vermögen. Als Stickstoffquelle können den Bakterien und Pilzen ungemein viele organische und mannigfaltige anorganische Stickstoffverbindungen dienen. Oft für künstliche Nährlösungen gebraucht und geprüft sind: Pepton, Harnstoff $CO(NH^2)^2$, Leuzin (α-Amidokapronsäure) $(CH^3)^2 : CH \cdot$

$CH^2 \cdot CH : NH^2 \cdot COOH$, Asparagin (Amidobernsteinsäureamid) $C^2H^3(NH^2) \cdot (COOH) \cdot (CONH^2) + H^2O$, Azetamid, Oxamid, Methylamin, Aethylamin, Ammoniumsalze (Chlorammon, weinsaures Ammon etc.) Nitrate, Parabansäure $CO(NH \cdot CO)^2$. Als Kohlenstoffquelle können ausser den kohlenstoffhaltigen Stickstoffverbindungen sehr viele stickstofffreie organische Verbindungen dienen; selbst Oxalsäure ist brauchbar. Für die Nährlösungen fanden z. B. Verwendung Monosaccharide: Dextrose (d-Glukose), Galaktose (d-Galaktose); zuckerähnliche Polysaccharide: Saccharose (Rohrzucker; d-Glukose + l-Fruktose), Maltose (d-Glukose + d-Glukose), Milchzucker (d-Galaktose und d-Glukose); mehrwertige Alkohole: Mannit (Alkohol der Mannose), Dulzit (Alkohol der d- und l-Galaktose), Glyzerin ($C^3H^5(OH)^3$; organische Säuren: Weinsäure $C^2H^2(OH^2)(COOH)^2$ (Dioxybernsteinsäure), Zitronensäure $C^3H^4(OH)(COOH)^3 + H^2O$ (Oxytrikarballylsäure), Milchsäure (Aethylidenmilchsäure) $CH^3CH(OH) \cdot COOH$, Äpfelsäure (Oxybernsteinsäure) $COOH \cdot CH^2CHOH \cdot COOH$, Bernsteinsäure $C^2H^4(COOH)^2$, Ameisensäure (Loew, Ueber einen Bazillus, welcher Ameisensäure und Formaldehyd assimilieren kann; Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. XII, S. 462).

Unter den organischen Stickstoffverbindungen gibt es einige, die für sehr viele Pilze und Bakterien als Stickstoffquelle dienen können, so z. B. das Pepton und das Asparagin, andere, welche nur von wenigen dieser Organismen bewältigt werden können.

Ferner können von denjenigen Stoffen, die von einer Spezies verwandt werden können, einige eine sehr energische Entwickelung der Spezies gestatten, andere eine nur sehr kümmerliche.

Manche Stickstoffverbindungen sind ganz im allgemeinen als sehr schlechte Stickstoffquellen zu bezeichnen, so z. B. Pikrinsäure, Nitrobenzoësäure, die Zyangruppe. Aehnlich verhält es sich auch mit den organischen Verbindungen, welche als Kohlenstoffquelle dienen können.

Nach den Untersuchungen von Czapek (1902 etc.) sind folgende Verbindungen gute Stickstoffquellen für Aspergillus niger, wenn sie in 1%iger Lösung mit 3% Rohrzucker zusammen gereicht werden.

Alkylamine: n-Butylamin, Glykosamin, Monobenzylamin.

Diamine: Tetramethylendiamin, Pentamethylendiamin.

Säureamide: Oxaminsäure, Sukzinimid.

Säurenitrile: Alle waren schlechte Stickstoffquellen.

Amidine: Guanidin.

Harnstoffderivate und Ureide: Alloxantin, Harnsäure, Oxalursäure, Dialursaures Natron; Harnstoff ist weniger gut.

Ammoniaksalze: Die Salze wirken um so besser, je verwendbarer der Säurerest ist; glyzerinphosphorsaures Ammon, phosphorsaures Ammon, milchsaures Ammon, oxybuttersaures Ammon, brenztraubensaures Ammon, oxalsaures Ammon, äpfelsaures Ammon, weinsaures Ammon.

Zyklische Stickstoffverbindungen: Amidolchlorhydrat, Zimtsäure, Salizylsäure, Gallussäure.

Im einzelnen sind die Spezies auf bestimmte Verbindungen ganz fein gestimmt, und können selbst äußerst nahe verwandte Verbindungen zur Gewinnung des C, N oder von Energie nicht benutzen oder viel weniger gut benutzen. So verhalten sich die angeführten Saccharomycesarten nach Hansen (1888) folgendermaßen gegen die angeführten Zuckerarten:

	Saccharose	Maltose	Dextrose	Galaktose
Saccharomyces Pastorianus } „ ellipsoideus }	+	+	+	0
„ Marxianus } „ exiguus }	+	0	+	0
„ apiculatus	0	0	+	0

Das Zeichen + bedeutet, daß der Pilz die Zuckerart vergärt, das Zeichen 0, daß er sie nicht angreift.

Sehr gut demonstriert diese Thatsache auch das Verhalten bestimmter Pilzspezies gegen optisch isomere Verbindungen (WINTHER, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. XXVIII, S. 3000).

Sind verschiedene relativ gut verwendbare Verbindungen als Quelle für ein Element gegeben, so werden sie alle gleichzeitig verbraucht, jedoch in verschiedenen Quantitäten. Die Größe des Verbrauchs wird dabei nicht nur von der Art der konkurrierenden Nährstoffe, sondern auch von der relativen Menge derselben beeinflußt. PFEFFER (Jahrb. f. wissensch. Botanik 1895, S. 221) fand z. B., daß große Mengen von Dextrose gleichzeitig in der Nährlösung vorhandenes Glyzerin vor dem Verbrauche durch Penicillium glaucum und Aspergillus niger schützen.

Von großer Bedeutung ist die Reaktion der Nährlösung oft für die Verwendbarkeit derselben. Im allgemeinen wachsen Spaltpilze in neutralen oder sehr schwach alkalischen (0,15 % Sodazusatz, BURI, 1893) Nährlösungen am besten. ELLIS fand z. B., daß schon ein Zusatz von 0,1 Tropfen einer $2^1/_2$proz. Phosphorsäure in 5 ccm Nähragar die Entwickelung von Sarcina ureae ungünstig beeinflußt, ebenso aber auch ein Zusatz von 2 Tropfen einer 5proz. Sodalösung. Es gibt jedoch zahlreiche Spaltpilze, welche schwach saure Nährlösungen gut verwenden können. Nach SCHLÜTER (Centralbl. f. Bakt., Bd. XI, S. 589) gedeiht der Bazillus der blauen Milch noch mit 0,2 % Milchsäure. Pilze wachsen oft in relativ sauren Nährlösungen sehr gut. Phanerogamen wachsen bekanntermaßen schon in Lösungen, deren osmotischer Wert 1,7—3 % Kochsalz beträgt, nicht mehr, während der osmotische Wert der Nährlösungen für Pilze und Bakterien bis auf 17 % Kochsalz steigen darf (ESCHENHAGEN, Einfluß der Lösungen versch. Konz. auf Schimmelpilze, 1889; BRUHNE, 1894; FISCHER, Jahrb. f. wiss. Bot. 1895, S. 151).

Die Entwicklung stand still in Lösungen folgender Körper, welche die angegebenen Prozente enthielten:

	Na Cl	$NaNO^3$
bei Aspergillus niger	17	21
„ Penicillium glaucum	19	21
„ Hormodendron Hordei	17—22	37—42
„ Bact. vernicosum	18—20	10—12

Wie verschieden die verschiedenen Nährlösungen für die verschiedenen Spaltpilze passend sind, lehrt z. B. die folgende von FISCHER (Vorlesungen über Bakterien, 1897 S. 53) nach eigenen Versuchen aufgestellte Tabelle.

Alle zu den Versuchen benutzten Nährlösungen enthielten die gleiche Menge der nötigen anorganischen Salze und reagierten, wo alkalisch angegeben ist, ganz schwach alkalisch. Es bedeutet: 3 sehr üppiges, 2 mittleres, 1 geringes, 0 kein Wachstum.

No.	Stickstoffquelle	Kohlenstoffquelle	Reaktion	Bacillus Anthracis	Bacillus typhi	Bacillus coli	Vibrio cholerae	Bacillus subtilis	Bacillus pyocyaneus
1	1 % Pepton	1 % Dextrose	alk.	3	3	3	3	3	3
2	1 „ Pepton		alk.	2	2	2	2	1	2
3	2 „ Asparagin	1 „ Dextrose	alk.	0	1	3	3	3	3
4	1 „ Asparagin	1 „ Dextrose	sauer	0	1?	3	0	2	3
5	1 „ Asparagin		alk.	0	0	2	2	1	1
6	1 „ Asparagin		sauer	0	0	1	0	1	1
7	1 „ Ammonium-tartrat	1 „ Glyzerin	alk.	0	0	2	1	3	3
8	1 „ Ammonium-tartrat		alk.	0	0	1?	0	0	1?
9	1 „ Chlorammon.	1 „ Glyzerin	alk.	0	0	3	2	2	2
10	1 „ Chlorammon.	1 „ Glyzerin	sauer	0	0	3	0	2	1
11	1 „ Kaliumnitrat	1 „ Dextrose	alk.	0	0	1	1?	2	3
12	1 „ Kaliumnitrat	1 „ Glyzerin	alk.	0	0	0	0	0	3
13		1 „ Rohrzucker	alk.	0	0	0	0	0	0?
14	1 „ Kaliumnitrat		alk.	0	0	0	0	0	0

Gleichmäßiger gegen die verschiedensten Nährsubstrate verhalten sich die in der folgenden Tabelle charakterisierten, aus Boden stammenden, aëroben, auf saurem Nährsubstrat gefangenen Bakterien, die GOTTHEIL (1901) untersuchte; doch treten auch hier starke spezielle Unterschiede auf.

Bacillus	0	I	I + Marmor	II	III	IV	V	V α	V β	V γ	V δ	VI	VII	VIII	IX	X	XI
ruminatus	4	4	4	3	0—1	1	3	4	2	2	2	2	3	0	1	3	0
tumescens	4	4	4	4	1	1	4	4	3	2	2	2	3	0	1	3	0
graveolens	4	4	4	4	1	0	2	4	—2	1—2	1—2	2	1	0	—1	—3	0
Petasites	3	3	3	4	0	0—1	2—3	3	3—4	4	3	3	2	0	0	3	0
Ellenbachensis	2	2—3	2	4	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
mycoides	4	4	4	2	3	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
subtilis	3	1—3	2	4	—1	—1	3	2	3	2	2	3	2	0	0	3	0
pumilus	2	2	3	3	0—1	1—2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
simplex	4	4	4	3	0—1	1	3	2	0	2	2	1—2	0	0	2	3	0
cohaerens	3	3	3	3	0	2	3	3	0—3	3	3	1	0	0	0	0—3	0
Carotarum	4	3	?	3	0—1	0—2	0	0	0	0	—2	1—2	2—3	0	0—1	0	0
fusiformis	3	3	?	3	1—2	0	0	0	0	0—1	0—1	0	0	0	0	0	0
asterosporus	—4	—4	—4	4	1	1	1—2	3	0	0	0	2—3	0	0	0—2	1	0

Die römischen Zahlen beziehen sich auf die Nährlösungen, die unter den gleichen Nummern auf S. 24 angeführt sind.

Zur Erklärung der Intensitätszahlen 0—4 füge ich den betreffenden Passus aus GOTTHEIL's unter meiner Leitung ausgeführter Arbeit an.

„Bei den Untersuchungen über die Entwickelungsintensität der Spezies in den verschiedenen Nährlösungen wurde zuerst darauf Rücksicht genommen, daß alle Kulturen in Reagensgläsern von ungefähr 1,5 cm Durchmesser und 15 cm Länge ausgeführt wurden und mit stets nur 5 ccm Lösung, da die Sauerstoffzufuhr und die Menge des Nährsubstrates für den Verlauf der Entwickelung von Bedeutung sind.

Geimpft wurde mit stets möglichst gleichen Mengen Stäbchenmaterials, welches sich auf Agar aus abgekochten Sporen nach 16—20 Stunden bei 28° entwickelt hatte. Von Sporen ging ich deshalb nicht aus, weil die Keimung in vielen Nährlösungen sehr ungleichmäßig und unsicher eintritt. Ich fand, daß häufig zu hohe Konzentration der Nährlösung der Grund für das Nichtkeimen war, während FISCHER (1895, S. 52) bei sinkendem Nährwert der Lösung ein Unregelmäßigwerden der Keimung eintreten sah. Die Temperatur, bei welcher die Kulturen gehalten wurden, betrug 28°. Die Bedeutung der Zahlen 0—1—2—3—4 ist die folgende: 0 = keine Entwickelung, Lösung vollständig klar; 1 = schwach, kaum Entwickelung vorhanden, Lösung meist schwach opaleszierend; 2 = Entwickelung, Lösung meist deutlich trübe, mikroskopisch normale Stäbchen; 3 = stärkere Entwickelung, Lösung stark getrübt; 4 = sehr starke Entwickelung, Lösung meist dick, undurchsichtig. Die Bezeichnungen 0 bis 4 geben für jede Spezies die Entwickelungsgrade in den verschiedenen Nährlösungen vergleichend an. Die Angaben für verschiedene Spezies sind aber nicht ohne weiteres untereinander zu vergleichen. So z. B. bedeutet 3 für die eine Spezies nicht eine absolut stärkere Entwickelung, als 4 für eine andere. Die relative Entwickelungsstärke ein und derselben Spezies in den verschiedenen Nährlösungen ist als diagnostisches Merkmal gut zu verwenden. Als unterscheidendes Merkmal zweier Spezies kann es ferner nach meiner Erfahrung noch gelten, wenn sich eine Spezies in einer bestimmten Lösung nicht (0) entwickelt, oder kaum (1), die Entwickelungsstärke in einer anderen Lösung dagegen mit 3 oder 4 zu bezeichnen ist. Dagegen ist auf die Unterschiede zwischen 1 und 2, 3 und 2 weniger Wert zu legen, so daß man also als einfachsten Ausdruck setzen kann, die eine Spezies entwickelt sich nicht, die andere gut.

Selbstverständlich ist bei dieser Frage nicht außer acht zu lassen, daß die Bakterienspezies mehr oder weniger befähigt sind, sich an die Nährlösungen anzupassen, und daß sie eventuell auch Varietäten bilden können, welche sich etwas verschieden gegen Nährlösungen verhalten.

Auch bei meinen Versuchen beobachtete ich, daß einige Bakterien, welche sich anfangs in einigen Nährlösungen nicht entwickelten, nach längerer Kultivierung auf Agar mit Dextrose in den betreffenden Nährlösungen Entwickelung zeigten. Erwähnen will ich z. B. auch die Beobachtung, daß Stäbchenmaterial von Bac. graveolens a und α in Nährlösung Vβ nach 8—14 Tagen (bei 28°) keine Weiterentwickelung zeigten, obgleich bei Impfung auf Agar die in der Nährlösung befindlichen Stäbchen sich lebhaft entwickelten. Nach 4 Wochen jedoch war eine schwache Vermehrung der Spezies in der Nährlösung eingetreten."

Interessant sind die Unterschiede, welche die Entwickelung der verschiedenen Spezies in der Nährlösung Vα (Asparagin + Rohrzucker) zoigten.

Sehr gut ernährt Asparagin in Verbindung mit Rohrzucker den Bacillus ruminatus, tumescens, graveolens, sehr schlecht Bacillus Ellenbachensis, Carotarum, asterosporus. Wie Rohrzucker oder Glycerin in Verbindung mit Asparagin verschieden wirken, lehren Bacillus ruminatus mit 4 in Nährlösung Vα (Rohrzucker), mit 2 in Nährlösung Vδ (Glyzerin) und Bacillus Carotarum mit 0 in Vα und 2 in Vδ.

Wir gehen nun zur Aufzählung der wichtigsten Nährlösungen über.

a) Gut kontrollierbare, konstante Nährlösungen.

Unter mineralischer Nährlösung ist hier immer die stickstofffreie „M-Nährlösung" (siehe S. 5) zu verstehen.

No. IV. Asparagin 1 g, min. Nährlösung 100 g.
No. X. Asparagin 1 g, Dextrose 3 g, min. Nährlösung 100 g.
No. V. Asparagin 1 g, Glyzerin 1 g, Rohrzucker 0,5 g, min. Nährlösung 100 g.
No. VII. Kaliumnitrat 1 g, Rohrzucker 0,5 g, Glyzerin 1 g, min. Nährlösung 100 g.
No. VIIα. Kaliumnitrat 1 g, Dextrose 1 g, min. Nährlösung 100 g.
No. VIIβ. Kaliumnitrat 1 g, Glyzerin 1 g, min. Nährlösung 100 g.
No. IX. Dextrose 0,5 g, Rohrzucker 0,5 g, Glyzerin 0,5 g, min. Nährlösung 100 g.
No. XV. Chlorammon 1 g, Dextrose 1 g, min. Nährlösung 100 g.
No. XVα. Chlorammon 1 g, Rohrzucker 0,5 g, Glyzerin 0,5 g, min. Nährlösung 100 g.
No. VI. Ammoniumtartrat 1 g, Glyzerin 1 g, Rohrzucker 0,5 g. min. Nährlösung 100 g.
No. VIα. Ammoniumtartrat 1 g, Dextrose 1 g, min. Nährlösung 100 g.
No. XII. Ammoniumlaktat 0,6 g, Asparagin 0,4 g, Chlornatrium 0,4 g, min. Nährlösung 100 g; annähernd die Nährlösung von Fränkel (1894).
No. XVI. Natrium asparaginicum 0,34 g, Ammoniumlaktat 0,6 g, Glyzerin 0,35 g, Chlornatrium 0,4 g, min. Nährlösung 100 g; annähernd nach Uschinsky.
No. XIV. Ammoniumzitrat 0,4 g, Ammoniumphosphat 0,06 g, Ammoniumsulfat 0,025 g, Weinsäure 0,4 g, Rohrzucker 7 g, Kaliumkarbonat 0,06 g, Magnesiumkarbonat 0,04 g, Zinksulfat 0,007 g, Eisensulfat 0,007 g, Kaliumsilikat 0,007 g, Wasser 100 g. Nährlösung für Aspergillus niger nach Raulin (Compt. rend., Bd. LVI, p. 229).
No. VIIIα. Kaliumnitrit 0,2 g, Soda 0,2 g, min. Nährlösung 100 g.

b) Wegen des Gehaltes an unbestimmten Nährsubstanzen nicht genau kontrollierbare Nährlösungen.

No. III. Pepton 1 g, Chlornatrium 0,2 g, min. Nährlösung 100 g.
No. II. Pepton 0,5 g, Mannit 1 g, Trockensubstanz der Bierwürze 1,5 g, Wasser 100 g.
No. I. Pepton 1 g, Fleischextrakt 1 g, Rohrzucker 1 g, Wasser 100 g.
No. Iα. Pepton 1 g, Fleischextrakt 1 g, Dextrose 1 g, Wasser 100 g.
No. 0. Pepton 1 g, Fleischextrakt 1 g, Dextrose 0,5 g, Rohrzucker 0,5 g, Milchzucker 0,5 g, Seignettesalz 0,1 g, Wasser 120 g.
No. IIIα. Pepton 1 g, Chlornatrium 0,5 g, Dextrose 1 g, Fleischwasser 100 g; besonders günstig für Spirillen.
No. IIπ. Pepton 0,5 g, Bierwürzetrockensubstanz 2,0 g, Wasser 100 g, 0,2 g offizinelle Phosphorsäure (v. 25 % Phosphorsäuregehalt); Nährlösung für Pilze.
No. XIV. Pepton 1 g, Ammoniumsulfat 1 g, Kaliumnitrat 1 g, min. Nährlösung 500 g; Nährlösung für Spirillen.

Fleischwasser. 3 kg grob zerkleinertes Fleisch (Pferdefleisch) werden in einen Topf von 7—8 Liter Inhalt, in welchem 5 Liter Leitungswasser auf 50—60° erhitzt sind, gethan und unter öfterem Um-

rühren 1—$1^1/_2$ Stunden lang sich selbst überlassen, dann unter stetem Umrühren über grosser Flamme, welche zeitweise entfernt wird, beinahe bis zum Kochen erhitzt, so daß das Eiweiß gerinnt. Hierauf wird die Flüssigkeit durch ein Seihtuch abgepreßt, der Rückstand mit 1 Liter H^2O übergossen und von neuem abgepreßt. Nach dem Einfüllen der trüben Flüssigkeit in sterile Literkolben mit Wattebausch und 30 Minuten langem Sterilisieren an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ist die Flüssigkeit gebrauchsfertig. Will man das Fleischwasser direkt als Nährflüssigkeit gebrauchen, so filtriert man, nach dem Absetzen, davon in 100 ccm-Kolben und sterilisiert dann nochmals.

Nährbouillon mit Fleischwasser. 1. Zu dem Fleischwasser werden zugesetzt: 1 % Pepton (WITTE) und $^1/_2$ % Kochsalz.

2. Kochen im Dampfstrom bis zur Lösung.

3. Neutralisieren mit gesättigter, wässeriger Lösung von Natriumkarbonat. Die Grenze ist erreicht, wenn blaues Lackmuspapier beim Tüpfeln nicht mehr gerötet wird; rotes wird dann schon gebläut. Hat man zu viel Alkali zugesetzt, so fügt man tropfenweise Phosphorsäure (auch Milch- oder Salzsäure) zu. Ein geringer Ueberschuß von Alkali schadet fast nie.

4. Kochen im Dampfstrom $^1/_2$ Stunde.

5. Filtrieren. — Nochmalige Prüfung der Reaktion des Filtrates, event. korrigieren, wiederum kochen und filtrieren. — Falls das Filtrat nicht klar ist, nochmals filtrieren.

5. Sterilisieren und Kochen oder nach Abfüllung in Röhrchen an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 20 Minuten.

Nährbouillon mit Fleischextrakt. Statt des Fleischwassers benutzt man eine 1prozentige Lösung von Fleischextrakt. Sonst wie Nährbouillon mit Fleischwasser, der diese Lösung nicht ganz gleichwertig ist.

Hefewasser. 250 g Preßhefe kocht man in 1 Liter destillierten Wassers $^1/_2$ Stunde lang. Man filtriert die heisse Flüssigkeit, versetzt sie mit 1 Liter Wasser, kocht abermals $^1/_2$ Stunde und filtriert sie in sterile 200 ccm-Kolben. Man erhitzt diese an zwei hintereinander folgenden Tagen nochmals 20 Minuten im Dampftopfe. Es kann in dieser Konzentration als Nährboden für Bakterien, Hefen und andere Pilze direkt Verwendung finden.

Gehopfte Bierwürze. Gehopfte Bierwürze wird vorzüglich zur Züchtung von Saccharomycesarten benutzt. Man bezieht sie aus einer Brauerei, füllt sie in sterile 200 ccm-Flaschen und sterilisiert die mit steriler Baumwolle oder mit Filtrierpapier, event. Staniol geschlossenen Flaschen im Dampftopf oder im Autoklaven. Gehopfte Würze enthält ungefähr 15 % Trockensubstanz, davon sind ungefähr 0,6 % stickstoffhaltige Substanzen, 9 % Maltose, 5 % Dextrin, 0,4 % Mineralstoffe. — In der Asche finden sich ungefähr 40 % Kali, 30 % Phosphorsäure, 2 % Magnesia, 5 % Kalk etc.

Ungehopfte Bierwürze. Wie die gehopfte Bierwürze aus einer Brauerei bezogen und behandelt.

Malzwürze. Will man sich Würze selbst herstellen, so verfährt man folgendermaßen. 250 g Darrmalz werden geschrotet oder zerstoßen und mit 1 Liter Wasser 1 Stunde bei 60—65° C. gehalten. Hierauf koliert man und kocht dann, bis zum Ausfällen der Eiweißstoffe, gelinde. Man füllt auf 1 Liter auf, filtriert nnd sterilisiert 20 Minuten im Auto-

klaven oder an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopfe. (Wir bezeichnen diese Würze zum Unterschied von der Bierwürze als Malzwürze.)

Bier. Man sterilisiert 500 ccm gutes, in einem sterilen, mit Baumwolle verschlossenen Kolben befindliches Lagerbier 20 Minuten im Autoklaven, setzt dann nach dem Erkalten 15 ccm 95proz. Alkohol hinzu, da die Hälfte des Alkohols beim Sterilisieren verdampft.

Traubenmost. Man besorgt sich entweder zur rechten Zeit Traubenmost, den man in gewöhnlicher Weise sterilisiert, oder verdünnt 1 Teil konzentrierten Traubenmost mit 3 Teilen Wasser und sterilisiert die Lösung.

Heuinfusum. 100 g gutes, trockenes Wiesenheu werden mit 5 Liter Wasser übergossen, einige Stunden stehen gelassen, 10—15 Minuten gekocht, abfiltriert, mit Soda genau neutralisiert (Lackmuspapier). Nach dem Neutralisieren wird das Infusum in dem mit Watte geschlossenen, sterilen Kolben 30 Minuten im Dampftopfe stehen gelassen. Nach zwei Tagen filtriert man, füllt in 200-ccm-Kolben um und sterilisiert im Autoklaven 30 Minuten oder an drei hintereinander folgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopfe.

Milchnährböden. Ueber Milchnährböden siehe MIGULA, 1897, S. 261; GÜNTHER, 1898, S. 177, 178, 199.

E. Gallertförmige Nährböden.

Nährgelatine.

Nährgelatine	Nährgelatine mit Dextrose (D-Nährgelatine)
500 ccm Wasser	500 ccm Wasser
6 g Pepton WITTE	6 g Pepton WITTE
4 g Fleischextrakt	4 g Fleischextrakt
1 g Kochsalz	1 g Kochsalz
50 g Gelatine	5 g Dextrose
	50 g Gelatine

Bei der Bereitung der Nährgelatine ist darauf zu achten, daß zu langes Erhitzen die Gelatine dünnflüssig macht, und daß sie das Erhitzen im Autoklaven (über 100°) nicht verträgt. Man bringt alle Ingredienzien in einen Kolben von 1000 ccm Inhalt, stellt ihn einige Zeit beiseite, bis die Gelatine gequollen ist, und erhitzt dann im Dampftopfe nur bis zur Lösung der Gelatine. Hierauf versetzt man die Lösung sehr sorgfältig mit konzentrierter Sodalösung, bis sie mit Lackmus eine deutliche, aber *sehr schwache* alkalische Reaktion zeigt, erwärmt die alkalische Lösung 20 Minuten und filtriert hierauf. Man prüft nochmals die Reaktion und macht die Lösung, wenn Säuerung eintrat, nochmals sehr schwach alkalisch. War Neutralisation nötig, so muß man nach der Neutralisation nochmals 30 Minuten im Dampftopf erhitzen. Dann filtriert man die Gelatine durch ein in einem Trichter, welchen man auf einen im Dampftopfe stehenden 1000 ccm-Kolben aufsetzt, befindliches Filter. Ist die Gelatine nicht genügend klar geworden, so fügt man zu der auf 30° abgekühlten Gelatine das Weiße von einem Hühnerei, schüttelt kräftig und längere Zeit um, erhitzt dann 50—60 Minuten im Dampftopfe und filtriert schließlich noch einmal. Die heiß filtrierte, *völlig klare* Masse wird entweder sogleich in mit sterilem Baumwollenbausch zu schließende, sterile 200 ccm-Kolben gegossen und dann noch an drei

hintereinander folgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopfe erhitzt oder sogleich in der nachher zu beschreibenden Weise in Reagensgläser gefüllt.

Nähragar.

Nähragar	Nähragar mit Dextrose (D-Agar)
6 g Pepton WITTE	6 g Pepton WITTE
4 „ Fleischextrakt (LIEBIG)	4 „ Fleischextrakt (LIEBIG)
1 „ Kochsalz	1 „ Kochsalz
500 „ Wasser	500 „ Wasser
8 „ Agar	8 „ Agar
	5 „ Dextrose

Zuerst fertigt man mit der Hälfte der angegebenen Menge Wassers und den vorgeschriebenen Mengen Pepton, Fleischextrakt, Chlornatrium eine Lösung an, neutralisiert dieselbe mit konzentrierter Natriumkarbonatlösung, erwärmt sie einige Zeit im Dampftopfe und filtriert dann die Lösung. Gleichzeitig benutzt man die andere Hälfte des Wassers zur Quellung des abgewaschenen Agars; nachdem derselbe, ungefähr 3 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehend, im Wasser gequollen ist, fügt man die vorbereitete neutralisierte Lösung hinzu, löst den Agar im Dampftopfe, läßt ihn dann noch ungefähr drei Stunden behufs Klärung bei 100° stehen, nötigenfalls neutralisiert man ihn nochmals mit Natriumkarbonatlösung, erwärmt ihn kurze Zeit und filtriert ihn sodann, indem man Kolben und Trichter mit Filter in den Dampftopf steckt. Nach der Filtration fügt man die vorgeschriebene Menge Dextrose hinzu und sterilisiert den jetzt fertigen Agar an drei aufeinander folgenden Tagen, oder (was aber dann bei Angaben über den benutzten Nährboden besonders zu vermerken ist) einmal 15—20 Minuten im Autoklaven.

HEYDEN-Agar (besonders auch für Wasserbakterien) (HESSE und NIEDNER 1899):

8 g Nährstoff HEYDEN
13 „ Agar
1000 „ Wasser

Alles wird in einen Literkolben gethan, dieser wird mit einem sterilen Baumwollenbausche verschlossen und im Autoklaven bei 125° 8 Minuten erhitzt. Der Agar wird dann im Dampftopfe filtriert und nochmals 8 Minuten im Autoklaven erhitzt.

Ist kein Autoklav bei der Hand, so kann man auch alles im Dampftopfe lösen und, wie gewöhnlich, dreimal je 20 Minuten an drei verschiedenen Tagen im Dampftopfe sterilisieren.

D-HEYDEN-Agar.

8 g Nährstoff HEYDEN
13 „ Agar
20 „ Dextrose
1000 „ Wasser.

Im Dampftopfe oder Autoklaven zu sterilisieren und zu filtrieren.

Heringsgelatine für Leuchtbakterien des Meeres.

2 Salzheringe
30 g Seesalz (zur Aushülfe auch nur Kochsalz)

100 g Gelatine
5 „ Asparagin
10 „ Glyzerin
10 „ Pepton
1000 „ Wasser

Die Salzheringe werden zerschnitten und in der Lösung des Seesalzes tüchtig gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert und zu dem Filtrate werden Gelatine, Asparagin, Glyzerin und Pepton hinzugefügt. Man sterilisiert und filtriert wie gewöhnlich.

Spirillenagar (ZETTNOW, 1896):

11 g Agar
1000 „ Fleischwasser
1 „ Pepton
1 „ Ammoniumsulfat
1 „ Kaliumnitrat.

Zur Herstellung von 1 Liter Spirillenagar wiegt man zuerst 11 g Agar ab und bringt ihn zum Waschen sowie zum Aufquellen in etwa 0,5 Liter Wasser. Hierauf wiegt man in einem gewogenen Emailletopf 1000 g Fleischwasser ab, setzt 1 g Pepton dazu, erhitzt fast bis zum Kochen und neutralisiert mit konzentrierter Sodalösung bis zur schwachen Bläuung des Lackmuspapiers. In die Flüssigkeit wirft man den gequollenen, etwas ausgedrückten Agar, löst ihn im Dampftopfe und wiegt. Man bringt das Gewicht der Masse durch Wasserzusatz oder Abdampfen im Wasserbade auf 1 kg. Hierauf setzt man 1 g Ammoniumsulfat und 1 g Kaliumnitrat hinzu, kühlt die Flüssigkeit auf 50—55° ab, fügt das Weiße von 2 Eiern hinzu, schüttelt tüchtig um, setzt das Gefäß 50—60 Minuten in den Dampftopf und filtriert dann. Man sterilisiert, wie gewöhnlich, dreimal im Dampftopfe.

Bierwürzgelatine: 1 Liter Bierwürze, 100 g Gelatine. Nach dem Lösen der Gelatine im Dampftopfe wird filtriert etc.

Mostgelatine: 1 Liter Most, 100 g Gelatine.

Heuinfusgelatine: 1 Liter Heuinfus, 80 g Gelatine.

Heuinfusagar: 1 Liter Heuinfus, 15 g Agar.

Milchserumgelatine: Siehe VAN PUTEREN, Centralbl. f. Bakt. 1889, Bd. V, S. 187.

Harn-Agar: Zu 2 Gewichtsteilen fertigem, geschmolzenem Nähragar (ohne Dextrose), den man mit 12 g Agar auf 500 g hergestellt hat, setzt man 1 Gewichtsteil an drei aufeinander folgenden Tagen je 15 Minuten im Dampftopfe erhitzten Harn.

Eiernährböden. Erstarrtes Weißei, Weißei und Gelbei gemischt und erstarrt, Gelbei erstarrt, Alkalialbuminat werden häufig benutzt. Siehe darüber MIGULA, 1897, S. 259; ABEL, 1900, S. 16; GÜNTHER, 1898, S. 175.

Blutserumnährböden. Blutserumnährböden kommen für uns nicht in Betracht. Man findet eingehende Angaben darüber bei GÜNTHER 1898, S. 169; ABEL, 1900, S. 14; MIGULA, 1897, S. 256 (Blutserumagar, S. 251). Sterilisieren des Blutserums durch Filtrieren mittelst Chamberlandfilter, ohne Druck: SCHONEBOOM, Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt. 1901, Bd. XXIX, S. 210.

Mehlnährböden. LAGERHEIM (Makkaroni als fester Nährboden; Centralbl. f. Bakt. 1892, Bd. XI, S. 147) wendet Makkaroni, MIGULA

(SCHNEIDER, Arbeiten aus dem bakt. Institut der Techn. Hochschule zu Karlsruhe, 1894, Bd. I, Heft 1) Reismehl zur Bereitung eines Nährbodens (besonders für chromogene Bakterien) an.

Quittenschleim (MIGULA 1897, S. 264). 50 g Quittensamen werden rasch unter der Wasserleitung auf einem Drahtsiebe abgewaschen und dann in einem Kolben mit 1 Liter Wasser unter Umschütteln stehen gelassen. Der Schleim wird durch dicken Flanell durchgepreßt, in kleinere sterile Kolben (100 ccm) gefüllt und an drei aufeinander folgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopfe sterilisiert. Der Schleim ist ziemlich dickflüssig.

F. Organisierte Nährböden.

Als Nährböden für Pilze und Bakterien verwendet man häufig sterilisierte Reservestoffbehälter der Pflanzen, von denen einige angeführt sein mögen. Bei diesen Nährsubstraten ist sehr darauf zu achten, daß dieselben nicht zu allen Zeiten die gleiche Zusammensetzung besitzen. Eine Kartoffel ist z. B. für unsere Zwecke sehr verschieden, wenn sie direkt nach der Ernte, im Frühjahr oder nach Aufenthalt bei niederer Temperatur im Winter benutzt wird. Die Reservestoffbehälter der Pflanzen besitzen alle eine äußerst komplizierte chemische Zusammensetzung Die Sterilisation der aus dem Boden stammenden Substrate muß besonders sorgfältig vorgenommen werden, weil an denselben oft sehr widerstandsfähige Sporen sitzen. Man thut deshalb gut, vorzüglich bei Benutzung des Dampftopfes zur Sterilisation, die sterilisierten Scheiben der Organe einige Tage zu beobachten, ehe man sie benutzt. Alle Reservestoffbehälter der Pflanze reagieren schwach sauer und sollen gewöhnlich schwach sauer zur Kultur der Bakterien Verwendung finden. Wird es nötig, so neutralisiert man die Pflanzenteile durch Kochen in einer 1 prozentigen Sodalösung oder reibt ihre Oberfläche mit Kreide oder Magnesiumkarbonat ab.

Die Kartoffel. Man schält gute Kartoffeln, wäscht sie sehr sorgfältig mit der Bürste, um die Sporen der Erdbakterien zu entfernen, unter der Wasserleitung ab, schält sie mit einem durch die Flamme gezogenen Messer nochmals nach, wäscht sie unter der Wasserleitung (ohne Bürste) tüchtig und schneidet sie in 1 cm dicke Scheiben. Letztere legt man, je eine oder zwei, in eine sterile Petrischale und sterilisiert sie durch 20 Minuten langes Erhitzen im Dampftopf an drei verschiedenen Tagen.

Die Kartoffel enthält ungefähr 12 % Wasser, 6 % Stickstoffsubstanz, 10,2 % Fett, 1 % Zucker, 75 % Stärke, 2 % Zellulose, 2 % Asche.

Alle jetzt nun weiter anzuführenden Reservestoffbehälter werden wie die Kartoffel behandelt.

Die Möhre. Sie enthält ungefähr: 87 % Wasser, 1,2 % Stickstoffsubstanz, 0,3 % Fett, 2 % Rohrzucker, 4 % Fruchtzucker, 3 % andere N-freie Stoffe, 1,5 % Zellulose, 1 % Asche.

Die Zuckerrübe. Sie enthält ungefähr: 82 % Wasser, 1,3 % N-Substanz (darunter Leuzin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Tyrosin; Cholin, Betain; Zitrazinsäure; Proteïnstoffe), 0,1 % Fett, 12 % Rohrzucker und etwas Raffinose, 1 % Zellulose, 1 % Asche. Von Säuren kommen darin in kleinen Mengen noch vor: Oxalsäure, Zitronen-

säure, Glyoxylsäure, Aepfelsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Weinsäure.

Topinambur. Die Knolle enthält ungefähr: 79 % Wasser, 1,8 % N-Substanz, 0,1 % Fett, 3,65 % reduzierender Zucker, 1,3 % Inulin, 12 % Lävulin, 1 % Asche, 1 % Zellulose.

Kohlrabi. Die Knolle enthält ungefähr: 85 % Wasser, 3 % N-Substanz, 0,2 % Fett, 0,4 % Zucker, 9 % sonstige N-freie Substanz, 1,5 % Zellulose, 1 % Asche.

Sellerie. Er enthält ungefähr: 84 % Wasser, 1,5 % N-Substanz, 0,4 % Fett, 0,8 % Zucker, 11 % sonstige N-freie Substanz, 1,5 % Zellulose, 0,8 % Asche.

Uebung 2.

Herstellen der Nährgelatine, des Nähragars und der Nährlösung und deren Sterilisation.

1. Wir stellen uns nach der auf S. 26 gegebenen Vorschrift 500 ccm D-Nährgelatine her.

2. Wir stellen uns nach der auf S. 27 gegebenen Vorschrift 500 ccm D-Agar her, den wir im Dampftopfe sterilisieren.

3. Wir stellen uns nach der auf S. 24 gegebenen Vorschrift in folgender Weise 250 ccm Nährlösung No. I her. Wir wiegen uns in einem Bechergläschen 5 g unseres sterilen Fleischextraktes (2 = 1; siehe S. 16) ab, spülen ihn mit 100 ccm Wasser in den Kolben, wiegen auf einer Handwage 2,5 g Pepton und 2,5 g Dextrose ab, geben sie auf ein Stück Papier und schütten sie mittels desselben in die Flasche. Wir fügen dann noch 150 ccm Wasser hinzu. Wir schließen die Flasche mit einem sterilen Baumwollenbausch und stellen sie in den Autoklaven. Wir sterilisieren 15 Minuten bei 120° (oder wir sterilisieren dreimal im Dampftopfe, wenn kein Autoklav zur Verfügung steht).

Uebung 3.

Füllen der Reagensgläser mit Nähragar und Nährgelatine und die Sterilisation der gefüllten Röhrchen.

Wir schmelzen zuerst unsere Nährgelatine, indem wir den Kolben mit der Nährgelatine in den Dampftopf setzen. Ist die Gelatine gegeschmolzen, so zünden wir einen kleinen Bunsenbrenner an (wir be-

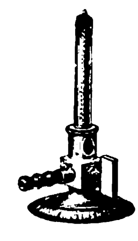


Fig. 10. Bunsenbrenner No. 5409a von Hugershoff mit Regulierung, mit Hahn und im Rohr befindlichen Röhrchen. Beim Schliessen des Hahnes bleibt ein kleines Flämmchen brennen, woran sich beim Oeffnen des Hahnes das ausströmende Gas entzündet.

nutzen bei allen unseren Uebungen den anbei abgebildeten Brenner). Wir stellen uns ferner 12 der sterilisierten, mit Baumwolle verschlossenen Reagensgläser zurecht.

Es kommt nun darauf an, diese Reagensgläser bis zu einer Höhe von 10 cm mit Gelatine zu füllen, ohne daß irgend ein Lebewesen in sie hineingerät. Diese Lebewesen können einmal aus der Luft in die Reagensgläser fallen, da aus der Luft immerfort gleichsam ein Regen von Sporen etc. mehr oder weniger senkrecht herabfällt; sie können auch außen an der Baumwolle und am Halse der großen Gelatineflasche und am Halse der Reagensgläser, sowie außen an der Baumwolle der Reagensgläser sitzen.

Wir entfernen von unserem die Gelatine enthaltenden Kolben die Baumwolle, legen den Baumwollenbausch auf eine reine Stelle (z. B. reinen Teller) und ziehen den Hals da, wo wir daraus ausgießen wollen, schnell durch die Flamme, um alle Keime am Rande des Kolbenhalses zu töten. Wir halten den Kolben stets in der rechten Hand, den Hals des Kolbens möglichst wagrecht. Hierauf öffnen wir ein Reagensglas, halten es horizontal, drehen den Reagensglashals etwas in der Flamme herum und gießen dann schnell, das Reagensglas etwas schräg haltend, Gelatine aus dem Kolben hinein. Den Baumwollenbausch haben wir mit den Fingern der linken Hand zugleich während der Zeit festgehalten. Wir ziehen jetzt sein unteres Ende, mit dem er in dem Reagensrohr stak, schnell durch die Flamme und verschließen mit dem abgesengten Baumwollenbausch das Reagensrohr. Zuletzt flammen wir den Baumwollenbausch, der zum Schliessen des Kolbens dient, ab und verschliessen mit ihm den Kolben, den wir danach 20 Minuten im Dampftopfe erhitzen, um den Rest der Gelatine zu konservieren.

In gleicher Weise füllen wir alle Reagensgläser und stellen sie in das Einsatzgefäß für den Dampftopf (Fig. 6).

Während der Zeit, in welcher wir die Reagensgläser mit Gelatine füllten, haben wir vielleicht unseren Kolben mit Nähragar im Dampftopfe stehen gehabt, bis der Nähragar geschmolzen ist. Wir schmelzen jedenfalls den Agar und gießen nun in gleicher Weise (und mit derselben Vorsicht) Agar in die Gläser, wie wir die Füllung der Gläser mit Gelatine vornahmen.

Wir füllen jedoch nur in 10 Gläser den Agar bis zu 10 cm Höhe. 10 andere Gläser füllen wir bis zur Höhe von 4 cm mit geschmolzenem Nähragar. Alle Röhrchen stellen wir in das Einsatzgefäß (Fig. 6).

Hierauf schreiten wir zur weiteren relativen Sterilisation der Röhrchen. Wir heizen den Dampftopf (Fig. 5) an, bis er in voller Dampfentwickelung ist, setzen das Einsatzgefäß mit den Röhrchen hinein und erhitzen 20 Minuten lang in vollem Dampfe. Wir löschen die Flamme unter dem Dampftopfe aus und stellen das Einsatzgefäß 24 Stunden beiseite. Hierauf sterilisieren wir nochmals 20 Minuten im Dampftopfe. Haben wir das Einsatzgefäß aus dem heißen Dampftopfe herausgenommen, so stellen wir die bis auf 10 cm mit Nährsubstrat gefüllten Gläser aufrecht in ein Glasgefäß, dessen Boden mit etwas Watte bedeckt ist und lassen sie aufrecht erkalten.

Die Agarröhrchen, welche nur bis zu 4 cm mit Agar gefüllt sind, legen wir schräg auf 1 cm hohe Holzleistchen von ungefähr 40 cm Länge auf und lassen sie erkalten (schräge Agarröhren).

Wir haben also 10 cm-Agarröhren, 10 cm-Gelatineröhren, schräge Agarröhren.

Uebung 4.

Herstellung und Sterilisation von Möhrenscheiben.

Wir reinigen eine möglichst dicke Möhre sorgfältigst durch Abbürsten mit konzentrierter Sodalösung und hierauf erfolgendem Waschen unter dem Wasserstrahle, schälen sie sorgfältig, waschen sie tüchtig unter Abreiben mit der reinen Hand unter dem Wasserstrahle der Wasserleitung und zerschneiden sie in 7 mm bis 1 cm dicke Scheiben. Wir legen je zwei bis vier in eine der sterilen Petrischalen, von denen wir 5 Stück beschicken. Wir sterilisieren die Möhrenscheiben durch 20 Minuten langes Erhitzen der beschickten Schalen im Dampftopfe an drei verschiedenen Tagen.

Uebung 5.

Herstellung von sterilem Wasser.

Wir füllen einen sauber gereinigten Kolben von 200 ccm Inhalt mit Leitungswasser zwei Drittel voll, schließen mit einem vorher im Heißluftschranke sterilisierten Baumwollenbausche und erhitzen im Autoklaven bei 125° 15 Minuten lang oder 3 Stunden im Dampftopfe.

Kapitel III.

Allgemeines über den Einfluss der Temperatur auf die Keimung der Sporen, das Wachstum des Mycels und der Oidien, sowie auf die Sporenbildung der Pilze und Bakterien. Anleitung zur Festlegung der Kardinalpunkte der Temperatur für diese Lebenserscheinungen und zur Benutzung der Kenntnis der Kardinalpunkte bei der Kultur der Bakterien und der Bestimmung der Bakterienspezies.

Litteratur.

Cohn, *Untersuchungen uber Bakterien IV, in den Beiträgen zur Biologie 1876. Bd. II.* — **Dieudonné,** *Beiträge zur Kenntnis der Anpassungsfähigkeit der Bakterien an ursprünglich ungünstige Temperaturverhältnisse; Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1894, S. 492. (Referat Centralblatt für Bakteriologie 1894, Bd. XVI, S. 965.* — **Emmerich und Weibel,** *Ueber eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen; Archiv für Hygiene 1894, Bd. XXI, S. 9.* — **Eriksson,** *Ueber die Förderung der Pilzsporenkeimung durch Kälte; Centralblatt für Bakteriologie 1895, Abteilung II, S. 557.* — **Fischer,** *Bakterienwachstum bei 0°, sowie über das Photographieren von Kulturen leuchtender Bakterien in ihrem eigenen Lichte; Centralbl. f. Bakt.. 1888, Bd. IV, S. 89.* — **Fischer,** *1897, S. 70.* — **Flügge,** *Die Mikroorganismen, 1896, I. T., S. 132.* — **Flügge,** *Die Aufgaben und Leistungen der Milchsterilisierung gegenüber den Darmkrankheiten der Säuglinge; Zeitschrift für Hygiene 1894, Bd. XVII, S. 272.* — **C. Forster,** *Ueber die Entwickelung von Bakterien bei niederen Temperaturen; Centralbl. f. Bakt. 1887, Bd. II, S. 337.* — **Galeotti,** *Lo Sperimentale 1892.* — **Globig,** *Ueber Bakterienwachstum bei 50—70°; Zeitschrift für Hygiene 1888, Bd. III.* — **Gottheil,** *Botanische Beschreibung einer Anzahl sporenbildender Bakterien; Dissertation, Marburg 1901.* — **Günther,** *Bakteriologie 1898, S. 27.* — **Hansen,** *Recherches sur les bactéries acétifiantes, Second mémoire; Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 1891—1894, Bd. III, p. 182.* — **Hansen,** *Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques, II. Les ascospore chez le genre Saccharomyces; Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 1883—1888, Bd. II, p. 13.* —

Havemann, *Ueber das Wachstum von Mikroorganismen bei Eisschranktemperaturen; Dissertation, Rostock 1894.* — **Heim,** *1894, S. 197 u. f.* — **Herzberg,** *Vergleichende Untersuchungen über landwirtschaftlich wichtige Flugbrandarten; Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen, herausgegeben von Zopf, 1895, Heft 5, S. 1.* — **Klebs,** *Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, Jena, 1896.* — **Klebs,** *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik 1900, Bd. XXXV, S. 134.* — **Alb. Klöcker,** *Die Gährungsorganismen, 1900, S. 33.* — **Lehmann,** *1896, II. Teil, S. 39.* — **Migula,** *1897, Bd. I, S. 358.* — **Miquel,** *Les Organismes viv. de l'atmosph. 1883, p. 182.* — **Miquel,** *Monographie d'un bacille vivant au delà de 70 centigrades (Bac. thermophilus); Annales de Micrographie 1888, I (Ref. Centralbl. f. Bakt. 1889, Bd. V, S. 282).* — **Mac Fadyen** *and* **Blaxall,** *Thermophilic bacteria; Journal of pathology and bacteriology, Bd. III, Heft 1.* — **Nägeli,** *Theorie der Gärung, 1879.* — **Nielsen,** *Sur le développement des spores du Sacch. membranaefaciens, Sacch. Ludwigii et du Sacch. anomalus; Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 1891—1894, Bd. III, p. 176.* — **Pedersen,** *Recherches sur quelques facteurs qui ont de l'influence sur la propagation de la levûre basse du Saccharomyces cerevisiae; Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, Kjoebenhavn 1882, Bd. I (1876—1882), p. 22.* — **Pfeffer,** *Pflanzenphysiologie, 2. Aufl. 1901, Bd. II, 1. Hälfte.* — **Lydia Rabinowitsch,** *Ueber die thermophilen Bakterien; Zeitschrift für Hygiene 1895, Bd. XX, S. 154.* — **Rodet,** *De l'importance de la température dans la détermination des espèces microbiennes en général et spécialement du bacille typhique; Compt. rend. Soc. biolog. 1889, No. 26.* — **Julius Sachs,** *Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen, Leipzig 1865, S. 45.* — **Schreiber,** *Ueber die physiologischen Bedingungen der endogenen Sporenbildung bei Bacillus anthracis, subtilis und tumescens; Centralbl. f. Bakt. 1896, Bd. XX.* — **Thiele,** *Temperaturgrenzen der Schimmelpilze; Dissertation, Leipzig 1896.* — **van Tieghem,** *Sur des Bactériacées vivant a la température de 74 centigr.; Soc. bot de France Bull. 1881, T. XXVIII, p. 35.* — **Wiesner,** *Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Entwickelung von Penicillium glaucum; Sitzber. d. Wien. Akad., Jahrg. 1873, Bd. LXVIII, Abt. 1, S. 5.* — **Zopf,** *Die Pilze, 1890, Breslau.*

Auf die Keimung der Sporen, auf das Wachstum der Myzelien und der Oidien, auf die Bildung der Sporen der Bakterien und Pilze hat die Temperatur einen bedeutenden Einfluß. Dieser Einfluß ist bis zu einem gewissen Grade meßbar, und die Größe des Einflusses, den die Temperatur auf verschiedene Spezies ausübt, ist konstant und kann als Kennzeichen für die Spezies benutzt werden. Aus diesem Grunde und deshalb, weil die Kenntnis dieses Einflusses für die Kultur der Pilze und Bakterien von Wichtigkeit ist, gehen wir hier etwas näher auf diese Verhältnisse ein.

Keimung der Samen und Sporen.

Wird der Samen einer höheren Pflanze bei relativ niederer Temperatur gehalten, so keimt er nicht. Erst wenn die Temperatur eine gewisse Höhe (das Minimum der Keimungstemperatur) erreicht hat, beginnt die Keimung. Ebensowenig keimt der Samen bei einer relativ hohen Temperatur; er beginnt erst bei dem Temperaturmaximum zu keimen. Es läßt sich also für jede Samenspezies ein Minimum und ein Maximum der Temperatur für die Keimung feststellen. So z. B. liegen die beiden Kardinalpunkte für einige Samen folgendermaßen:

Linum usitatissimum	1,8° C.	28° C.
Pinus silvestris	7—8°	34°
Phaseolus multiflorus	9,5°	46,2°

Solche Kardinalpunkte sind auch für einige Pilzsporen und Bakteriensporen festgelegt worden. HERZBERG (1895, S. 23) hat die beiden Kardinalpunkte der Temperatur für die Keimung von Ustilago Avenae durch Beobachtung von Deckglaskulturen festgestellt und zugleich noch

das Optimum aus der Länge der Zeit erschlossen, welche nach der Aussaat der Sporen bis zur Keimung verging: Es lag

das Minimum zwischen 5 und 11 °,
das Optimum (Temperatur : Zeit) zwischen 22 und 30 °,
das Maximum zwischen 30 und 35 °.

WIESNER fand für die Konidienkeimung von Penicillium glaucum:

Minimum 1,5—2,5 °,
Optimum 22 °,
Maximum 41—43 °.

Das Nähere findet sich in der folgenden Tabelle, welche zugleich die noch später zu erwähnenden Zahlen für Myzelwachstum und Sporenbildung gibt.

WIESNER benutzte als Substrat frische Zitronenscheiben, die er mit Fließpapier abgetrocknet hatte, und Sporen, welche bei 10—12 ° zur Entwickelung gekommen waren, und ließ in dicht geschlossenen Gläsern keimen und wachsen. Er beobachtete die Keimung, die Myzelbildung (mikroskopisch und makroskopisch) und die Konidienbildung.

Penicillium glaucum auf Zitronenscheiben.

Temperatur	Zeit (in Tagen) von der Aussaat der Sporen bis zum Eintritt der Keimung	Zeit (in Tagen) von der Aussaat der Sporen bis zum Sichtbarwerden d. Myzels	Zeit (in Tagen) von der Aussaat bis zum Erscheinen der Sporen
1,5	5,8	—	—
2	5,5	—	—
2,5	3	6	—
3	2,5	4	9
3,5	2,25	3,5	8
4	2	3	7,75
5	1,5	2,9	7
7	1,2	3	6,25
11	1	2,3	4
14	0,75	2	3
17	0,75	2	3
22	0,25	1	1,5
26	0,5	0,99	2
32	0,7	1,01	2,1
35	0,4	1,5	1,58
38	0,55	2,25	2,6
40	0,7	2,5	3,5
42—43	0,3	1,8	—

WETTSTEIN (Sitzb. d. Wiener Akad., 1885, Bd. XCI, S. 40) fand für die Keimung der Konidien von Rhodomyces Kochii:

Minimum 2—4 °,
Optimum 20—40 °,
Maximum 50 °.

Als Beispiel für das Verhalten der Bakteriensporen bei verschiedenen Temperaturen diene das Resultat einer Untersuchung von SCHREIBER (1896, S. 432). Dieser fand folgende Keimungszeiten der Sporen für eine Nährlösung, welche 1 % Liebigs Fleischextrakt und 1 % Pepton enthielt

Temperatur	Bacillus anthracis	Bacillus subtilis	Bacillus tumescens
		Zeit	
8°	—	8 Tage	—
10°	—	6 „	—
12°	6 Tage	5 „	14 Tage
14°	4 „	4 „	8—10 „
15°	4 „	3 „	8 „
20°	24 Stunden	26 Stunden	90 Stunden
25°	24 „	20 „	72 „
30°	12 „	10 „	48 „
34°	10 „	7 „	45 „
37°	8—10 „	5 „	40 „
40°	8 „	5 „	40 „
42°	12 „	5 „	48 „
45°	15 „	5—7 „	—
47°	—	7 „	—
50°	—	10 „	—

GOTTHEIL fand, daß auf Dextroseagar bei 28° die Keimung von Bacillus subtilis schon nach 5—6 Stunden eintrat. Unter gleichen Verhältnissen keimten die Sporen von Bacillus ruminatus, graveolens, cohaerens in 5—6 Stunden, von Bacillus tumescens, Ellenbachensis, pumilus in 5 Stunden, Bacillus simplex und Carotarum in 6 Stunden, Bacillus fusiformis in 7—8 Stunden, Bacillus Petasites in 4—5 Stunden. Alle diese Resultate sind jedoch nur annähernde.

SCHREIBER bestimmte also die Kardinalpunkte, indem er die Zeit verglich, die bis zum Eintritte der Keimung bei verschiedenen Temperaturen verlief.

Wir würden eine Bestimmung dieser Art folgendermaßen vornehmen. Wir würden das Sporenmaterial eine bestimmte, beim Resultate anzugebende Zeit abkochen und mit ihm ein bestimmtes Nährsubstrat (z. B. Dextroseagar), auf dem die Spezies gut wächst, impfen. Das Nährsubstrat würde sich für Aeroben in bestimmter Menge in Reagensgläsern bestimmter Größe und Weite befinden. Je zwei Reagensgläser würden bei bestimmter Temperatur gehalten und die ersten Keimungsstadien, die in den Reagensgläsern aufträten, würden mittelst des Mikroskopes aufgesucht werden.

Wir könnten aber auch folgendermaßen verfahren. Wir nähmen 50 ccm einer passenden Nährlösung, beimpften sie reichlich mit Sporenmaterial, erhitzten eine passende Zeit auf 100°, um die Oidien abzutöten, brächten je 5 ccm von dem Gemisch in ein Reagensglas und stellten jedes der 10 Gläser bei einer anderen Temperatur eine gleiche Zeit beiseite. Hierauf bestimmten wir mittelst der Zählkammer, wie viele Sporen in der Volumeneinheit gekeimt wären. Die Zahl der gekeimten Sporen würde als Maßstab für die Wirkung der Temperatur dienen.

Wachstumsintensität der Myzelien und Oidien bei verschiedenen Temperaturen.

Wie schon aus der Tabelle auf S. 34 hervorgeht, hat WIESNER auch für das Mycelwachstum von Penicillium glaucum die Kardinalpunkte der Temperatur festgestellt. Er fand 2,5°, 26°, 42—43°. Die Methode, nach welcher das Resultat gewonnen wurde, ist bei der Tabelle an-

gegeben. HERZBERG (1895, S. 23) fand für das Wachstum der Hyphen von Ustilago Avenae folgende Kardinalpunkte: Minimum 6°, Optimum zwischen 18 und 26°, Maximum zwischen 30 und 34°. Er schätzte für die Bestimmung den Grad der Entwickelung der auf Agargelatine (1 Agar, 1 Gelatine, 1 Pepton, 1 Fleischextrakt, 2 Dextrose) wachsenden Kolonien des Pilzes.

Für praktische Zwecke mögen noch folgende Angaben über Kardinalpunkte nach OLSEN, SIEBENMANN, RAULIN, LICHTHEIM, THIELE, COHN, ELFVING (siehe ZOPF, 1890, S. 202; PFEFFER, 1901, S. 87) Platz finden: Aspergillus flavus: Opt. 36–38°; Aspergillus fumigatus: Min. 15°, Opt. 38—40°, Max. 60°; Aspergillus clavatus: Opt. 20—30°; Aspergillus subfuscus: Opt. 35—38°; Aspergillus niger: Min. 7—10°, Opt. 33—37°, Max. 40—43°; Aspergillus albus: Opt. 15—25°; Aspergillus ochraceus 15—25°; Eurotium repens: Min. 7°, Opt. 25—30°, Max. 38°; Eurotium herbariorum: Min. 10°, Opt. 20–25°, Max. 30°.

Für Saccharomyces cerevisiae fand PEDERSEN (1882) das Minimum der Temperatur für das Wachstum zu 0°, das Optimum zu 28°, das Maximum zu 40°.

Er versetzte Würze mit einer Kleinigkeit Hefe (Saccharomyces cerevisiae), schüttelte um, verteilte die infizierte Würze, welche in der Volumeneinheit ($^1/_{2000}$ cmm) 6,4 Zellen (n^0) enthielt, in 50 ccm-Kolben und stellte die letzteren in den Thermostaten von PANUM, in verschieden erwärmte Abteilungen.

Nach 24 Stunden wurden die folgenden Zahlen (n^1) von Hefezellen in der Würze gefunden:

Temperatur	Zahl	Die Zahl war gewachsen um	$\frac{n^1}{n^0}$	Zahl der Generationen	Zeit für die Verdoppelung einer Zelle
bei 4°	14,4	8	2,3	1,2	20 Stunden
„ 13,5°	30,5	24	5	2,3	10,5 „
„ 23°	77,2	70,8	12,8	3,7	6,5 „
„ 28°	112,6	106,2	17,6	4,1	5,8 „
„ 34°	40,9	34,5	6,4	2,6	9 „
„ 38°	6,4	0	1	0	∞ „

Die Wachstumsintensitäten der Bakterien bei verschiedenen Temperaturen würden sich in ähnlicher Weise festlegen lassen, wie es von PEDERSEN bei Saccharomyces cerevisiae geschehen ist. Auch würde es möglich sein, größere Mengen von einer bestimmten Nährlösung mit sehr wenig Oidien zu beschicken, eine genügende Zahl von je 100 ccm dieser Nährlösung bei verschiedenen konstanten Temperaturen so kurze Zeit stehen zu lassen, daß noch keine Sporenbildung eintreten könnte, dann die Lösungen zu zentrifugieren und schließlich den Bodensatz mit einer bestimmten Menge der Flüssigkeit auf einem Uhrglase einzudampfen und zu wiegen. Das Gewicht der Trockensubstanz der Nährflüssigkeit müßte besonders bestimmt und abgezogen werden. Exakte Versuche ähnlicher Art sind mir nicht bekannt. Im allgemeinen hat man bisher nur die drei Kardinalpunkte durch makroskopische Schätzung der Entwickelungsgröße der bei verschiedenen Temperaturen gewachsenen Kolonien bestimmt.

Im allgemeinen ist über die Lage der Kardinalpunkte zuerst zu bemerken, daß es so scheint, als lägen die Minima für viele Spaltpilze

noch etwas unter 0°. FORSTER (1887) und FISCHER (1888) fanden Bakterien (FISCHER nur ein Pilzmyzel), deren Kolonien bei 0° noch relativ gut wuchsen, aber auch bei Zimmertemperatur fortkamen, in Milch, Gartenerde, Kanalwasser u. s. w. Micrococcus prodigiosus und Bacillus violaceus wachsen bei 7° C. üppig (HAVEMANN, 1894) auf Nährgelatine.

EMMERICH und WEIBEL (1894) fanden als Erreger einer Forellenseuche einen Spaltpilz, dessen Optimum sie auf ungefähr 10—15° schätzten. Bei denjenigen pathogenen Bakterien, welche Warmblüter bewohnen, liegt das Optimum höher. Für den Tuberkelbazillus sind die Kardinalpunkte ungefähr: Min. 30°, Opt. 38°, Max. 41°. Der Typhusbazillus wächst bei 7° nicht mehr, ebensowenig Bacillus cholerae asiaticae, Streptococcus erysipelatis; Bacillus anthracis, Staphylococcus pyog. citreus, albus, aureus wachsen dagegen noch bei dieser Temperatur (HAVEMANN, 1894) auf Nährgelatine.

Für Bacillus acidi lactici fand FLÜGGE (1894, S. 300) das Optimum 27°, das Maximum 40°.

Für die Oidien seiner in Doppelbier wachsenden Essigbakterien fand HANSEN (1891—94, S. 198) folgendes:

	Minimum	Optimum	Maximum
B. aceti	4—5°	34°	42°
B. Pasteurianum	5—6°	34°	42°
B. Kützingianum	6—7°	34°	42°

Der peptonisierende Bacillus Nr. II von FLÜGGE (1894, S. 301) zeigte nach Schätzung folgende Kardinalpunkte:

Minimum	(Mittl. Wachstum)	Optimum	(Mittl. Wachsum)	Maximum
22°	28°	40°	50°	60°

VAN TIEGHEM (1881) kultivierte in einer neutralen Bohnenabkochung einen Mikrokokkus und einen sporenbildenden Bazillus bei 74°, der erst bei 77° abstarb. Wenig früher hatte MIQUEL eine ähnliche Beobachtung gemacht. GLOBIG (1888) ließ bei Temperaturen von 56 bis 70° Kartoffelscheiben, die er mit Gartenerde bestäubt hatte, stehen und fand, daß sich darauf Bakterien entwickelten. Bei 70° wuchsen nur noch wenige Kolonien, bei 68° wenige Arten, bei 56—58° zahlreiche Arten. Fast alle wuchsen schon bei 40° nicht mehr. Eine Spezies gedieh noch zwischen 15 und 68°, eine andere zwischen 37 und 62°. RABINOWITSCH fing in gleicher Weise im Thermostaten von 62—63° Bakterien auf Kartoffelscheiben, die durch Erde, Milch, Exkremente, Spreewasser etc. infiziert wurden. Für seine Bakterien 1, 2, 3 lagen nach Schätzung die Kardinalpunkte ungefähr folgendermaßen:

Minimum	Optimum	Maximum
42—54°	62,5°	75°.

Die Kardinalpunkte für die Sporenbildung.

Die Kardinalpunkte für die Konidienbildung von Eurotium repens hat KLEBS (1896) annähernd festgestellt. Er ging von Konidien aus, die bei 28—29° gewachsen waren, ließ Kulturen auf Brot oder konzentriertem Moste (20proz.) wachsen und bestimmte die Zeit, welche bei verschiedenen Temperaturen bis zur Konidienbildung verlief. Er erhielt folgende Resultate:

7—8°	nur schwaches Myzelium nach 14 Tagen					
8—9°	es	erscheinen	Konidienträger	nach	10—12	Tagen
10—12°	„	„	„	„	8—10	„
13—15°	„	„	„	„	4—5	„
15—18°	„	„	„	„	3—4	„
20—22°	„	„	„	„	2—3	„
22—25°	„	„	„	„	1—2	„
26—30°	„	„	„	„	20—40	Stunden
35—36°	„	„	„	„	2—3	Tagen
37—38°	nur kümmerliches Myzel.					

Hansen untersuchte den Einfluß der Temperatur auf die Askosporenbildung verschiedener Hefearten. Die Hefe wurde 24 Stunden bei 26—27° C. in Würze kultiviert, dann wurde etwas von der Kultur auf Gipsblöcke gebracht, und diese wurden in einen Thermostaten gestellt. Es wurde geprüft, wann die Sporenbildung begann:

Saccharomyces cerevisiae I

37,5°	keine Entwickelung der Sporen				
36—37°	erste	Sporenanfänge	nach	29	Stunden
35°	„	„	„	25	„
33,5°	„	„	„	23	„
30°	„	„	„	20	„
25°	„	„	„	23	„
23°	„	„	„	27	„
17,5°	„	„	„	50	„
16,5°	„	„	„	65	„
11—12°	„	„	„	10	Tagen
9°	keine Sporen.				

Für andere Spezies fanden Hansen und Nielsen (1891—1894) die folgenden Kardinalpunkte:

	Minimum	Optimum	Maximum
S. Pastorianus I	31,5	27,5	0,5
S. Pastorianus III	29	25	4
S. ellipsoideus I	32,5	25	4
S. anomalus Hansen	34	30	3,5
S. Ludwigii Hansen	34	30	3

Zur Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Sporenbildung der Bakterien kann man in folgender Weise verfahren.

1. Man wählt ein bestimmtes, günstiges, flüssiges Nährsubstrat, impft 500 ccm desselben mit abgekochtem Sporenmateriale der zu untersuchenden Spezies und bestimmt die Zahl der reifen Sporen in der Volumeneinheit. Je 50 ccm der Mischung stellt man in den Bedürfnissen des Spaltpilzes angepaßten Gefäßen bei einer bestimmten Temperatur beiseite, alle 10 Portionen bei verschiedener Temperatur. Nach passender Zeit untersucht man, unter Anwendung von Methylenblau als Färbemittel für unfertige Sporen oder von Chloralhydrat zur Erkennung der reifen Sporen, die durch Zusatz von etwas Säure oder Aetzkali getöteten Kulturen gleichzeitig auf die Zahl der reifen Sporen in der Volumeneinheit und bemißt danach den Grad der Einwirkung der Temperatur.

2. Man impft etwa 100 ccm der Nährlösung mit jungen Oidien, gießt je 10 ccm in ein Reagensglas und stellt jedes der 10 Gläser bei

einer anderen Temperatur beiseite. Man stellt die Zeit fest, welche bis zum Erscheinen der ersten Sporenanlagen verläuft.

SCHREIBER (1896) bestimmte für 3 Spaltpilze, welche in einer Nährlösung aus 1 g Fleischextrakt, 1 g Pepton, 100 g Wasser wuchsen, die Kardinalpunkte, wie es aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist:

Temperatur	Bacillus anthracis	Bacillus subtilis	Bacillus tumescens
	Zeit der Sporenbildung		
8°	—	—	—
10°	—	14 Tage	—
12°	—	14 „	14 Tage
14°	10 Tage	12 „	8—10 „
15°	8 „	8 „	8 „
20°	96 Stunden	96 Stunden	90 Stunden
25°	84 „	80 „	72 „
30°	62 „	55 „	48 „
34°	48 „	45 „	45 „
37°	40 „	36—40 „	40 „
40°	36—40 „	36 „	40 „
42°	40 „	34 „	48 „
45°	—	30—34 „	—
47°	—	36 „	—
50°	—	—	—

GOTTHEIL (1901) fand folgende Zeiten für den Beginn und Verlauf der Sporenbildung auf Dextroseagar in den von uns benutzten Reagensgläsern. Dabei ist zu bemerken, daß die Sporenbildung auf dem trockenen Teile der schrägen Agarfläche zuerst beginnt und nach unten zu langsamer stattfindet. Die Zeiten sind auch nur oberflächlich festgestellt.

Bacillus ruminatus 20—40 Stunden, tumescens 36—40, Petasites 24—36, Ellenbachensis 80, subtilis 72—96, pumilis 96—168, simplex 72, cohaerens 72—96, Carotarum 144—168. Ob Bac. tumescens von SCHREIBER mit Bac. tumescens A. M. et GOTTHEIL identisch ist, weiß ich nicht. Bac. subtilis braucht nach SCHREIBER in der Nährlösung bei 25° 84, bei 30° 62, bei 28° danach ungefähr 70 Stunden, auf Agar, nach GOTTHEIL, 72—96 Stunden, was eine für diagnostische Zwecke event. genügende Uebereinstimmung ist.

Allgemeines über den Einfluss der Temperatur auf die Bakterien.

Fassen wir noch einige allgemeine Resultate der Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die in Rede stehenden Lebenserscheinungen ins Auge.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß es Algen gibt, welche unter 0° C. und solche, welche über + 80° C. zu wachsen vermögen. Für einige Bakterien ist gutes Wachstum noch bei 0° möglich und ist die Möglichkeit des Wachstums bei 75° sicher festgestellt. Für die Bakterien beträgt also das Temperaturintervall, innerhalb welchem Wachstum der Bakterien möglich ist, mindestens 75°. Das Temperaturintervall für das Wachstum einer Spezies aber beträgt höchstens 45°, so für einen schlanken Bazillus, den GLOBIG (1888) untersuchte. Gewöhnlich liegt das Temperaturoptimum dem Maximum näher als dem Minimum (jedoch Bac. subtilis 5 · 24 · 50). Die Kardinalpunkte der Tem-

peratur sind für Sporenkeimung, Myzelwachstum und Sporenbildung einer Spezies nicht gleich. So z. B. waren die Kardinalpunkte

für die Keimung von Ustilago Avenae	5—11°	22—30°	30—50°
für das Wachstum	6°	18—25°	30—34°
für das Wachsen von Saccharomyces cerevisiae	etwas unter 4°	28°	38°
für die Sporenbildung von Saccharomyces cerevisiae	9°	30°	37,5°.

Meist liegen sich aber doch die Optima einander nahe, so daß man für die Praxis der Kultur mit einer Mitteltemperatur auskommt, welche zwischen den verschiedenen Optima liegt.

Betrachten wir ferner den Einfluß, den verschiedene Momente auf die Lage der Kardinalpunkte ausüben. Für alle diese Kardinalpunkte der Temperatur ist festzuhalten, daß sie nur für diejenigen Verhältnisse absolute Geltung haben, bei denen sie festgestellt wurden, da sie von vielen Momenten merklich abhängig sind, welche die Thätigkeit der Protoplasten im allgemeinen beeinflussen. Für Bakterien sind bisher diese Einflüsse nicht genau untersucht. In erster Linie ist die Zusammensetzung des Nährbodens zu beachten.

Thiele (1896) kultivierte Penicillium glaucum und Aspergillus niger in Kochflaschen von 150 ccm Inhalt, die mit 25 ccm auf Lackmus neutral reagierender Nährlösung gefüllt und mit sterilem Wattepfropfen verschlossen waren. Als Nährlösung diente eine stickstoffhaltige, anorganische Nährlösung, die mit Glyzerin oder Traubenzucker oder ameisensaurem Natrium versetzt war. Es wurden hauptsächlich die Maxima für eine erste ins Auge fallende Entwickelung und die Erreichung einer zusammenhängenden Myzeldecke (Deckenbildung) ins Auge gefaßt.

Wie aus der nachfolgenden Tabelle hervorgeht, wird das Temperaturmaximum für Penicillium auf Glyzerin um 5° C. und auf Ameisensäure um 4° C. gegenüber Dextrose erhöht. Dazu mag aber noch bemerkt werden, daß Dextrose auch in höherer Temperatur als bestes Nährmedium unter den dreien anzusehen ist, obgleich die Keimung auf Glyzerin und Ameisensäure bei Temperaturen erfolgt, bei denen sich bei Dextrose keine Entwickelung mehr feststellen läßt.

Entwickelung von Penicillium glaucum auf Nährlösung mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Dextrose 4 %, Glyzerin 2 %, ameisensaures Natrium 0,5 % (4 % Dextrose isotonisch mit 2 % Glycerin). Durch die Zahlen werden die Tage angezeigt, die bis zu dem bezeichneten Punkte verstrichen. E = Entwickelung beginnt, D = Deckenbildung beginnt, Sb = Substrat ist bedeckt, G = Grösse der Decke.

	Dextrose				Glyzerin				Ameisensäure			
mp. °C.	E	D	Sb	G	E	D	Sb	G	E	D	Sb	G
19	3	4	6	—	4	5	7	—	5	7	11	—
23	2	3	4	—	3	4	5	—	4	6	9	—
25	1	1,5	2	—	2	2,5	3	—	3	6	9	—
27	2	3	4	—	1	2	5	—	2	5	7	—
29	3	4	6	—	1	4	6	—	2	4	8	—
30	3	5	9	1/2	2	4	7	—	3	5	9	—
31	4	—	—	—	2	5	9	—	4	7	11	—
33	—	—	—	—	3	6	15	3/4	5	10	16	3/4
34	—	—	—	—	4	8	18	1/2	6	12	20	1/2
35	—	—	—	—	4	—	—	—	7	—	—	—
36	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—

Dabei ist aber auch die Konzentration der Nährlösungen zu beachten, denn diese hat ebenfalls auf die Lage der Kardinalpunkte Einfluß. Als THIELE die Konzentration der Dextroselösung erheblich steigerte, verschob sich das Temperaturmaximum um 4° C. nach oben.

Entwickelung von Penicillium glaucum auf verschieden konzentrierter Traubenzuckerlösung.

(Die Prozente geben das Gewichtsvolumen an; durch die Zahlen werden die Tage angezeigt, die bis zu der bezeichneten Entwickelung verstrichen.)

	Entwickelung beginnt			Deckenbildung beginnt			Substrat ist bedeckt		
Temp. °C.	4%	30%	50%	4%	30%	50%	4%	30%	50%
19	3	3	4	4	5	7	6	7	10
23	2	3	3	3	4	7	4	7	9
25	1	2	2	1,5	3	6	2	5	8
27	2	3	3	3	5	6	4	6	9
29	3	3	4	4	6	7	6	10	11
30	3	4	5	5	7	8	9 (halbe Decke)	11	13
31	4	5	7	—	8	10	—	14	17
33	—	6	8	—	9	12	—	17 (halbe Decke)	21 (halbe Decke)
34	—	9	12	—	—	15	—	—	—
35	—	—	15	—	—	—	—	—	—
36	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Bei Penicillium und Aspergillus übte die Reaktion des Nährsubstrates nur einen geringen Einfluß auf die Lage des Maximums aus.

Wie aus den Tabellen hervorgeht, liegt das Optimum für die erste Entwickelung (ungefähr für die Keimung) auf 4 % Dextrose bei 25°, auf 2 % Glyzerin bei 27°, auf 50% Dextrose bei 25°, und es entwickeln sich bei 29° die Sporen in 4 % Dextrose nach 3 Tagen, in 2 % Glyzerin nach 4 Tagen, in 50 % Dextrose nach 4 Tagen. Aehnliche Unterschiede fand KLEBS (1896) für die Bildung der Konidienträger von Eurotium repens. Sie erschienen auf Brot und auf Most von 20 % nach 20—40 Stunden, auf solchen von 40 % nach 48 Stunden, von 80 % nach 72 Stunden, von 100 % nach 6 Tagen, auf Glyzerin von 1 % nach 1 Tage, von 50 % nach 8 Tagen.

Die Sauerstoffmenge, welche zu Pilzen und Bakterien Zutritt hat, besitzt Einfluß auf die Lage der Kardinalpunkte. Bei der Bestimmung der Lage der Kardinalpunkte der Temperatur für die Sporenbildung bei Bakterien ist auch darauf zu achten, daß die Sauerstoffzufuhr bei Aeroben (Bac. subtilis) von Bedeutung für die Schnelligkeit der Sporenbildung ist. Für gewisse fakultativ anaerobe Bakterienspezies fiel das Minimum des Wachstums bei Fehlen von Sauerstoff auf 34—44° C., bei Sauerstoffzufuhr auf 50° C.

Auch das Licht ist in manchen Fällen von Einfluß auf die Lage der Kardinalpunkte der Temperatur (BREFELD, Bot. Unters. über Schimmelpilze 1877, III, S. 93; GRÄNTZ, Einfl. des Lichtes auf die Entwickelung einiger Pilze, Dissertation, Leipzig 1898, S. 29).

Von Bedeutung für die Lage der Kardinalpunkte der Temperatur kann ferner auch der Wechsel der Intensität einzelner Einflüsse sein. So z. B. fand SCHREIBER (1896, S. 374), daß plötzliche Entziehung der Nährstoffe nach guter Ernährung die Sporenbildung bei

Bacillus anthracis, subtilis und tumescens, für die gleiche Temperatur, beschleunigten. Wenn nach 24stündigem Wachstum die Flocken oder Häute der drei Bakterien in kleine Schälchen gebracht wurden, die mit 2proz. Kochsalzlösung gefüllt waren, so trat für Milzbrand eine Beschleunigung der Sporenbildung um 20 Stunden, für Bacillus subtilis und tumescens eine solche um 16 Stunden ein.

Auf die Keimung von Samen und von Pilzsporen wirken Temperaturschwankungen beschleunigend ein (PEDERSEN, Arb. d. Bot. Inst. zu Würzburg, 1874; v. LIEBENBERG, Bot. Centralbl. 1884; PAMMER, Österr.-ungar. Zeitschr. f. Zuckerindustrie u. Landw., 1892; SCHINDLER, Die Lehre vom Pflanzenbau, Wien, C. FROMME, 1896, allg. Teil, S. 79).

Von nicht zu unterschätzender Bedeutung auf die Lage der Kardinalpunkte ist in manchen Fällen auch eine Vorbehandlung der betreffenden Objekte. So z. B. keimen Bakteriensporen relativ langsam, wenn sie vorher einige Zeit auf eine relativ hohe Temperatur erwärmt wurden (ELLIS). ERIKSON (1895) fand, daß die Sporen von Aecidium Berberidis, Peridermium Strobi etc. nach einer 1–2tägigen Abkühlung auf 0—7° besser als ohne diese Behandlung keimten.

Zuletzt müssen wir hervorheben, daß die Lage der Kardinalpunkte einer Bakterienspezies auch durch Gewöhnung an höhere oder niedere Temperaturen verändert werden kann. DIEUDONNÉ (1894, S. 494) fand folgendes: Bacillus fluorescens, welcher bei 22° Farbstoff (daneben dann stets auch Trimethylamin) bildet, wurde zu Versuchen benutzt, welche zeigen, daß bei sehr langsamer Steigerung der Temperatur und je 24stündiger Umimpfung der Kultur die Temperaturgrade, bei welchen die Species „gut" wächst, innerhalb ungefähr $2^1/_2$ Monaten über das normale Wachstumsmaximum hinaus erhöht werden können.

Die Versuche verliefen folgendermaßen:

Kardinalpunkte im Anfang	Optimum	Gutes Wachstum ohne Pigment	Gutes Wachstum mit Pigment	Maximum ungefähr
	22°	35°		37,5°
Nach 18. Impfung bei 35°			35°	
Die 18. „ „ 35°		37,5°		
„ 12. „ „ 37,5°		38,5°		
„ 30. „ „ 37,5°			tritt nicht ein	
„ 10. „ „ 38,6°		40,5°		
„ ∞ „ „ 38,6°			„	
„ 12. „ „ 40,5°		41,5°		
„ ∞ „ „ 40,5°			„	
„ ∞ „ „ 41,5°		tritt bei 42,5° nicht mehr ein	„	absolutes Max. über 42°

Dabei trat bis zur Temperatur 41,5° die Pigmentbildung stets wieder ein, wenn eine Abimpfung bei 22° kultiviert wurde. Aehnlich verhielt sich Bacillus lactis erythrogenes. Weniger günstig gestalteten sich die Resultate bei Bacillus fluorescens, erythrogenes, Micrococcus prodigiosus. In ähnlicher Weise steigerte TSIKLINSKY (Annal. d. l'Inst. PASTEUR 1899, Bd. XIII, S. 793) das Maximum von Bacillus subtilis im Laufe von 30 Umimpfungen von 50–58°.

Es ist sehr leicht möglich, daß es sich bei diesen Versuchen, bei denen übrigens die Schätzungen nur wenig genau waren, um Auslese von Varietäten der Spezies handelt, welche etwas abweichende Kar-

dinalpunkte besitzen, nicht eigentlich um eine Angewöhnung. Unter allen Umständen muß der Grad der Variationsfähigkeit oder Gewöhnungsfähigkeit für jede Spezies eine annähernd konstante Größe und feststellbar sein.

Einige praktische Regeln.

Für dieses Praktikum, welches vorzüglich lehren soll, wie man Bakterienspezies fängt, wie man die Bakterienspezies kultiviert, beschreibt und bestimmt, lassen sich aus den besprochenen Thatsachen folgende Regeln ableiten:

Das Fangen der Spezies. Wenn man ein Nährsubstrat mit einem Stoffe, welcher verschiedene Spezies enthält, z. B. mit Erde, infiziert, so werden je nach der Temperatur, bei welcher man das Nährsubstrat hält, verschiedene Spezies wachsen. Will man möglichst alle Spezies, welche ein solcher Stoff enthält, fangen, so muß man deshalb verschiedene Portionen des mit ihm geimpften Substrates (oder besser verschiedene Substrate) konstanten Temperaturen von ungefähr 0, 12, 28, 38, 50° aussetzen. Will man die Spezies durch Temperatureinflüsse gleich von vornherein möglichst isolieren, so kann man drei Portionen ein und desselben Nährsubstrates (z. B. Nähragar) bei 0°, 28° und 55° halten.

Die Kultur der Spezies. Die Kultur einer bestimmten Spezies gelingt nur gut, wenn man die Spezies bei der optimalen Temperatur erzieht. Es ist also zweckmäßig, die optimale Temperatur für die zu kultivierende Spezies annähernd zu bestimmen. Eine geringe Anpassung an Temperaturen, die über oder unter dem normalen Optimum liegen, ist möglich.

Die Definition der Spezies. Für die Definition der Spezies können die Kardinalpunkte der Temperatur für Sporenkeimung, Mycel (Oidien)-Wachstum und Sporenbildung mit benutzt werden. Es ist zu beachten, daß die Kardinalpunkte für diesen Zweck bei Verhältnissen festgestellt werden müssen, die jederzeit wieder hergestellt werden können, wenn die Spezies bestimmt werden soll. Bestimmte konstante Temperatur, in ihrer Zusammensetzung bestimmte und kontrollierbare Nährsubstrate, genau in Form und Größe bestimmte Kulturgefäße (bestimmte Sauerstoffzufuhr), event. bestimmte Nährstoffmengen sind zuerst zu geben und bei Angabe der Kardinalpunkte zu notieren.

Kapitel IV.

Der Brutschrank oder der Thermostat.

Bei der Ausführung von Kulturen, bei der Bestimmung der Kardinalpunkte, bei der Bestimmung der Bakterienspezies u. s. w. sind Apparate kaum zu entbehren, welche gestatten. die Kulturen der Pilze und Bakterien lange Zeit konstanten Temperaturen auszusetzen. Von diesen Apparaten, die man Thermostaten nennt, handelt das folgende Kapitel.

Am meisten wird der sogleich genauer zu beschreibende Thermostat, welcher für Temperaturen zwischen 26 bis 70° Verwendung finden kann, gebraucht. Da wir in diesem Praktikum nur Bakterien

untersuchen werden, deren Wachstumsoptimum ungefähr bei 28° liegt, so stellen wir den Thermostaten auf 28° C. ein.

Thermostaten für konstante Temperaturen von 16° und weniger liefert Rohrbeck (Katalog 63. 1900, S. 175, Nr. 1013) für 145 Mk. oder Lautenschläger (Katalog 60, S. 62, No. 116 u. 117).

Für die Festlegung der Kardinalpunkte der Temperatur für Pilze und Bakterien würde man sich vorteilhaft des Panum'schen Thermostaten bedienen (KLÖCKER 1900, S. 33 und MEDDELELSER fra Carlsberg Laboratoriet 1882, p. 26).

Ungefähr für je drei Praktikanten braucht man einen Brutschrank, dessen Arbeitsraum 40 cm hoch, 25 cm breit und 25 cm tief ist, und stellt besser zwei solcher Apparate als einen größeren auf, da zwei kleine Apparate nicht so oft geöffnet werden müssen als ein großer, wenn mehrere Praktikanten damit arbeiten, und weil man eventuell die beiden Thermostaten einmal auf verschiedene Temperaturen einstellen kann. Man schafft am besten vollständig aus Kupfer gearbeitete Apparate an, da diese am dauerhaftesten sind. Ich benutze das Modell Nr. 60 der Preisliste 1902, Abt. II von Paul Altmann mit Thermoregulator, zwei feinen Thermometern und einer Sicherheitslampe (Preis ungefähr 200 Mk.).

Zu dem vollständigen Thermostaten gehört also 1. der Thermoregulator, 2. die Sicherheitslampe, 3. der eigentliche Schrank.

a. Der Thermoregulator.

Man verwendet am besten einen Dampftensionsregulator nach LOTHAR MEYER's Prinzip.

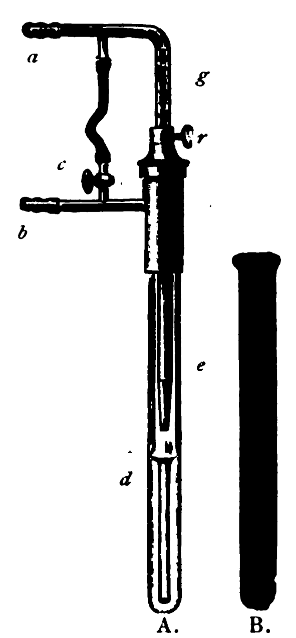


Fig. 12. A. Thermoregulator. B. Hülse dazu.

Gut ist der Dampftensionsregulator mit Zweigleitung, den Altmann (Verzeichnis Teil II, 1902, Nr. 81) liefert. Der Regulator (Fig. 12 *A*) wird in eine Metallhülse eingesetzt (Fig. 12 *B*), welche oben durchlöchert ist, so daß Wasser in sie eindringen kann, und welche doch im unteren Teil das Quecksilber des Regulators auffängt, wenn das Glasgefäß des Regulators zerbricht.

Das Gefäß dieses Regulators wird für Temperaturen bis zu 40° C. mit Aether und Quecksilber, für Temperaturen von 40° bis 70° mit Aether + Alkohol (eventuell reinem Alkohol) und Quecksilber, für höhere Temperaturen mit Luft und Quecksilber gefüllt. Es muß deshalb bei der Bestellung angegeben werden, für welche Temperatur der Regulator ungefähr bestimmt ist. Die leicht verdampfende Flüssigkeit liegt über dem Quecksilber und bringt durch die Spannkraft ihres Dampfes das Quecksilber in der engeren Röhre um so mehr zum Steigen, je mehr die Temperatur anwächst. So schließt dann bei steigender Temperatur das Quecksilber die mit einem seitlichen Schlitze versehene Eisenröhre (*c*, Fig. 12) mehr und mehr, welche der graduierten Messingröhre (*g*) dicht angeschlossen ist. Durch letztere strömt das Gas ein, um durch die

untere Röhre (b) auszutreten und von da aus nach der Heizflamme zu gelangen. Steigt das Quecksilber, so wird also schließlich die Flamme mehr und mehr verkleinert. Sie würde zuletzt verlöschen, wenn nicht eine kleine Nebenleitung angebracht wäre, durch welche ein wenig Gas direkt von der Zuleitung des Gases (a) nach der Flamme (durch b) gelangen könnte. Da es wichtig ist, daß die Flamme, welche durch diese Nebenleitung unterhalten wird (die Notflamme) nicht an sich den Thermostaten über die gewünschte Temperatur erwärmt, also nicht zu groß wird, so ist ein Hahn (c) in der Nebenleitung angebracht, mittelst dessen man die Notflamme (entsprechend dem Gasdrucke) so klein wie möglich stellen kann.

Dieser Regulator ist etwas vom Luftdrucke abhängig. Steigt das Barometer um 2,7 mm, so steigt auch die Temperatur des Brutschrankes, welcher durch diesen Regulator auf konstanter Temperatur erhalten werden soll, um 0,1° C.

Ist dieser Thermoregulator in die Hülse und diese in das Wasser des Brutschrankes eingesenkt, so stellt man den Thermoregulator in folgender Weise auf die bestimmte Temperatur ein.

Man erhitzt zuerst den Brutschrank auf die gewünschte Temperatur. Hierauf schiebt man das Rohr e so tief, dass die Notflamme gerade so weit wie möglich verkleinert wird. Dabei ist zu beachten, daß das Quecksilber in einer für die Temperatur annähernd passenden Menge eingefüllt und die verdampfende Flüssigkeit richtig gewählt sein muß. Hierauf stellt man die Notflamme mittelst des Hahnes c möglichst klein und wartet den Effekt ab. Hält sich die Temperatur noch nicht genau auf der gewünschten Höhe, so reguliert man durch geringes Ausziehen oder Einschieben des Rohres e nochmals nach und stellt das Rohr schließlich, wenn die Temperatur die richtige Höhe behält, durch den Ring r fest.

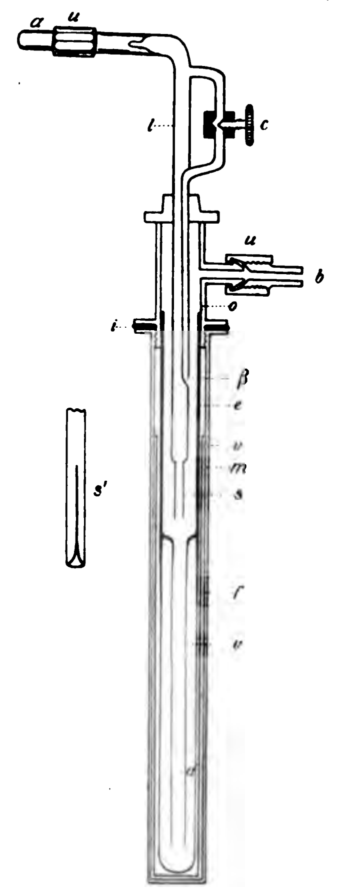


Fig. 13. Sicherheitsregulator. u Muttern, e Eisenrohr, a Eintritt des Gases, s u. s' Austrittsöffnung des Gases mit Schlitz, b Austritt des Gases nach der Sicherheitslampe, α Eintritt des Gases in die Nebenleitung, β Austritt des Gases aus der Nebenleitung, v Glasrohr mit einem angeschmolzenen Rohre v', d Raum zur Aufnahme von Quecksilber und Aether, f Eisenrohr, m Messingrohr, welches über das Stück o übergeschraubt ist und mittelst des Leders i gasdicht verbunden wird.

Ich verwende jetzt ausschließlich ein verbessertes Modell des zuletzt beschriebenen Regulators, welches von Altmann auf meine Veranlassung hergestellt worden ist. Es hat dieser „Sicherheitsregulator“ (Fig. 13) den Vorzug, völlig feuersicher zu sein. Es sind an ihm gegenüber dem vorher beschriebenen Modelle folgende Aenderungen angebracht worden. Die Rohrstücke a und b sind dazu eingerichtet,

an die Bleirohre angelötet zu werden. Ein Bleirohr wird an den Gashahn gelötet und an das Rohrstück *a*, das andere an *b* und an ein Rohrstückchen der von Altmann zugleich anschraubbar lieferbaren Sicherheitslampe (Fig. 15). Die Nebenleitung für die kleine Menge Gas, welche das Verlöschen der Flamme verhüten soll, geht von *a* ab und ist ganz aus Metall. Ueber das Gasrohr *v* ist ein Messingrohr geschraubt, in welchem ein unten geschlossenes dünnes Eisenrohr steckt. Dieses Rohr würde beim Zerbrechen des Glasrohres *v* das Ausströmen des Gases verhindern und das Quecksilber würde im Eisenrohre liegen bleiben. Bei Benutzung des Apparates füllt man in das Rohr *m* so viel Olivenöl, daß das Rohr nach dem Einsetzen des Glasrohres zur Hälfte oder etwas mehr gefüllt ist. dann stellt man den Apparat in den Thermostaten, ohne dass das Messingrohr an das obere, mit dem Rohr *b* verbundene Messingrohr angeschraubt ist, und erst, wenn die Temperatur auf die gewünschte Höhe (28° z. B.) gestiegen ist, schraubt man das Rohr fest an.

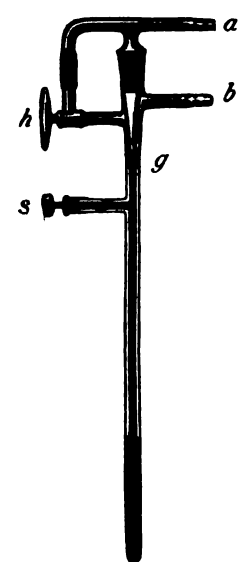
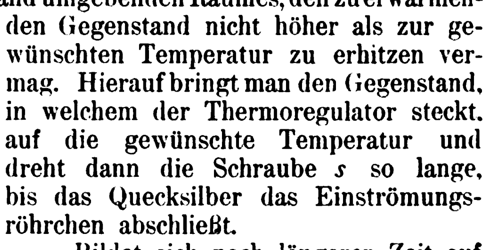


Fig. 14. Thermoregulator nach REICHERT.

Für sehr kleine Apparate, z. B. Mikroskopwärmschränke. wendet man besser den REICHERT'schen Thermoregulator an, den ich hier schliesslich noch kurz beschreiben will.

Das in Fig. 14 abgebildete Modell ist das vorteilhafteste. Der Apparat ist mit Quecksilber gefüllt. Durch die Schraube *s* kann das Quecksilber etwas emporgehoben oder gesenkt werden. Bei *a* strömt das Gas ein, bei *b* aus. Bei *g* wird das Einströmungsröhrchen durch das Quecksilber eventuell abgeschlossen. *h* ist der Hahn zur Notflamme. Diese Notflamme stellt man nach Emporschrauben des Quecksilbers bis zum Schlusse des Einströmungsröhrchens zuerst so klein, daß sie, bei höchster Temperatur des den zu erwärmenden Gegenstand umgebenden Raumes, den zu erwärmenden Gegenstand nicht höher als zur gewünschten Temperatur zu erhitzen vermag. Hierauf bringt man den Gegenstand, in welchem der Thermoregulator steckt, auf die gewünschte Temperatur und dreht dann die Schraube *s* so lange, bis das Quecksilber das Einströmungsröhrchen abschließt.



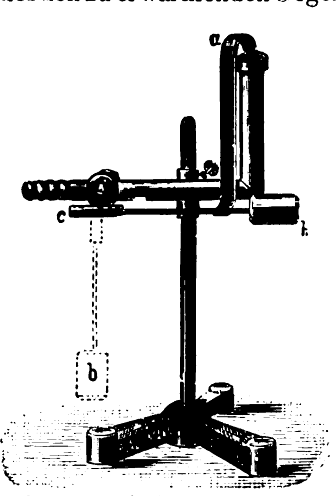


Fig. 15. Sicherheitsbrenner.

Bildet sich nach längerer Zeit auf der Quecksilberoberfläche ein schwarzer Körper, so muß dieser mit etwas Watte entfernt werden, da sonst der Apparat unregelmäßig arbeitet.

b. Der Sicherheitsbrenner.

Da es beim Einfrieren der Gasleitung, beim Sinken des Gasdruckes etc. leicht eintreten kann, daß die Heiz-

flamme des Thermostaten erlischt, und daß dann später wieder ein gefährliches Ausströmen des Gases aus dem unbewachten Brenner stattfindet, so ist es zweckmäßig, zur Heizung des Brutschrankes einen Sicherheitsbrenner zu benutzen.

Dieser Brenner (Fig. 15) erwärmt einen Metallbügel (*a*), welcher, solange er warm ist, den Hebel (*b c*), welcher am Hahn (*c*) der Lampe befestigt ist, unterstützt und in wagrechter Lage den Hahn dadurch zugleich in offener Stellung erhält. Kühlt sich der Bügel beim Verlöschen der Flamme ab, so zieht sich der den Hebel tragende Arm infolge Zusammenziehens des Bügels (*a*) zurück, der Hahnhebel (*b c*) gleitet ab, fällt senkrecht hinab, dreht dadurch den Hahn (*c*) um und schließt so die Gaszufuhr ab. Verlischt also die Flamme, so wird die Gaszufuhr abgeschnitten.

c. Der Brutschrank.

Will man den Brutschrank in Gang setzen, so versichert man sich zuerst, daß das Kautschukrohr., welches das Wasserstandsrohr

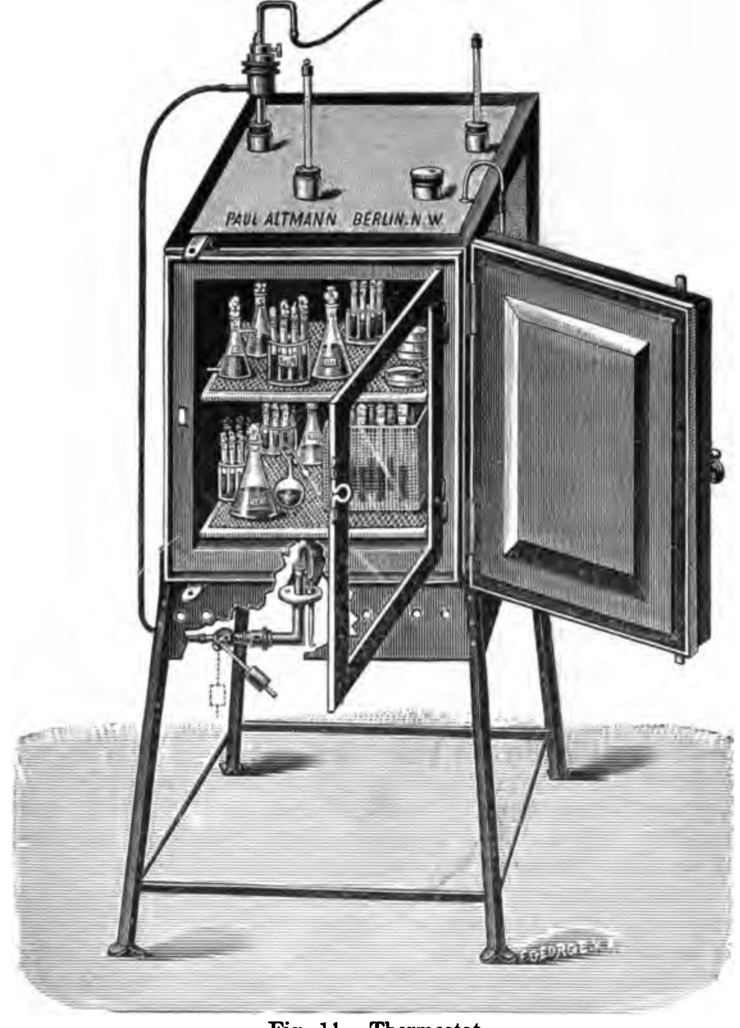


Fig. 11. Thermostat.

dichtet, in Ordnung ist. Hierauf füllt man den Außenraum mit Wasser, welches um ungefähr 5° höher erwärmt ist als die gewünschte Temperatur des Brutschrankes. Diese soll für unsere Arbeiten stets 28° betragen. Man wartet dann, bis das Thermometer des Brutraumes annähernd konstant auf der gewünschten Temperatur steht, eventuell wärmt man durch die Brenner etwas nach. Hierauf stellt man den Thermoregulator ein.

Der Brutschrank ist mit einer Glastür versehen, durch welche man die Kulturen beobachten kann, ohne den Brutraum zu öffnen. Man mache es sich zur Regel, den Schrank nur dann zu öffnen, wenn es absolut nötig ist und ihn sofort wieder zu schließen, damit die Kulturen nicht unnütz abgekühlt werden. Zur Lüftung des Brutschrankes sind durch Kappen verschließbare Lüftungsöffnungen angebracht. Die Kappen fettet man mit Vaseline gut ein und schließt die Oeffnungen ungefähr halb. Will man das Verdampfen der Kulturflüssigkeit, bei geöffneten Kappen herabdrücken, so stellt man eine Krystallisierschale mit Wasser unten in den Brutschrank.

Für Arbeiten mit wenigen kleinen Kulturen, bei denen die Temperatureinstellung oft gewechselt werden muss, und bei denen es auf sehr genaues Einhalten der Temperatur ankommt, eignet sich der Thermostat nach Oswald-Pfeffer, den Pfeffer (Zeitschrift f. wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik 1890, Bd. VII, S. 433—449) beschreibt und den z. B. Rohrbeck im Kataloge 63 unter Nr. 1037 anbietet. Ich habe ihn von Mechanikus Petzold in Leipzig, Bayerische Straße Nr. 13, bezogen.

Kapitel V.

Die Agarstrichkultur, die Platinöse und die Platinnadel.

Wir gehen nun dazu über, uns zwei Agarstrichkulturen mit abgekochten Sporen von Bacillus asterosporus und mit Sporen von Bacillus tumescens herzustellen.

Die Spezies Bacillus asterosporus und tumescens können von Kral (Bakteriologisches Laboratorium, Prag I, Kleiner Ring 11) bezogen oder auch in der später zu lehrenden Weise auf Möhren gefangen werden. Sie sind sehr verbreitet in der Erde und im frischen Pferdemiste.

Die Agarstrichkulturen werden in der Weise hergestellt, daß man die schräge Agarfläche eines Agarröhrchens mit der in das Sporenmaterial eingetauchten Platinöse sanft in einem Striche von unten nach oben zu überfährt, ohne in das Kondenswasser einzutauchen. Will man die Kultur für diagnostische Zwecke, also zur Bestimmung der Spezies benutzen, so muß man stets gleich weite und gleich hohe Reagensgläser (15 cm Höhe, 13 mm Durchmesser), die gleich hoch mit Agar angefüllt sind und stets gleich bereiteten Agar von gleicher Reaktion und ungefähr gleichem Alter benutzen. Die Röhrchen dürfen nicht zu lange aufbewahrt sein, so daß eine normale Menge Kondenswasser vorhanden ist. Die Temperatur, bei welcher die Entwickelung der Kolonie stattfindet, ist konstant zu halten und ist genau anzugeben. Unter Umständen kann es vorteilhaft sein, die Kolonien bei zwei ver-

schiedenen Temperaturen wachsen zu lassen und den Einfluß der Temperatur mit in die Beschreibung aufzunehmen. Wenn irgend möglich, ist von reinem (abgekochtem) Sporenmateriale auszugehen, und es ist anzugeben, welches Material (ob reine Sporen, ob Sporen und Oidien, ob reine Oidien) man zur Aussaat benutzte.

Bei der Beschreibung des makroskopischen Aussehens der Kulturen hat man festzuhalten, daß alle auffallenden Veränderungen, welche im Laufe einer monatelangen Entwickelung der Kultur an der Oberflächenkolonie und dem Agar vor sich gehen, angegeben werden müssen, dass also die Entwickelungsgeschichte der Kolonie beschrieben werden muß. Das äußere Ansehen der Kolonie kann dabei recht verschieden werden, und es können für die Beschreibung die folgenden von LEHMANN (1896, S. 115) vorgeschlagenen Ausdrücke benutzt werden.

a) Optische Oberflächenbeschaffenheit: saftig glänzend (höchster Grad des Glanzes), fettglänzend, mattglänzend, matt, mehlig bestäubt, durchscheinend, irisierend, undurchsichtig, kreidig.
b) Konsistenz: schleierig, häutig, lederartig, fadenziehend, schleimig, knorpelig, brüchig, butterartig.
c) Randbeschaffenheit (bei schwacher Vergrößerung) der Kolonie: ganzrandig, rauh, glatt, gezähnt, gelappt, ausgebuchtet, zerrissen, kurzhaarig, langhaarig, lockig, verfilzt.
d) Innere Zeichnung: homogen (ohne Zeichnung), zonentragend, streifig, fein punktiert, grob punktiert, gekörnt, grob gekörnt, feinlappig, groblappig (schuppig), unregelmäßig fleckig, geflammt, lockig, gekrümelt, verfilzt.

Ferner muß beachtet werden die Färbung der Kolonie, das Leuchten der Kolonie, der Geruch der Kolonie etc.

Das Aussehen der Kulturen kann eine gewisse Bedeutung zur Unterscheidung zweier Spezies erlangen, wenn man die beiden Spezies nebeneinander unter gleichen Bedingungen kultiviert und die Entwickelungsgeschichte beider Kulturen vergleicht.

Wichtiger als das makroskopische Aussehen ist das mikroskopische Verhalten der Agarkultur. Dabei ist zu beachten, daß die Entwickelungsstadien der Morphoden in der Bakterienkolonie oben, in der Mitte und unten ungleich verlaufen, so daß man bei mikroskopischer Untersuchung der Entwickelung der Agarkolonie stets von diesen drei Regionen Proben mittelst der Platinöse entnehmen muß. Diese Entnahme und Untersuchung muß ungefähr alle 6 Stunden erfolgen, wenn man die wichtigsten Phasen der Entwickelung der Kolonie festlegen will.

Die Platinnadeln. Wir brauchen zur Herstellung der Strichkulturen und Stichkulturen etc. eine Platinöse und eine Platinnadel (in seltenen Fällen einen kleinen Platinspatel). Man kann dazu 8 cm lange Platindrähte benutzen, die in einen Glasstab gut eingeschmolzen werden. Die Platindrähte haben die Dicke von 0,4 mm und bleiben entweder gerade (Platinnadel) oder werden oben zu einer Öse von 2,5 mm äußerem Durchmesser gebogen (Platinöse). Altmann liefert sie eingeschmolzen zu 80 Pfg.

Ich benutze Platinnadeln, -ösen und -spatel von der in der Figur (16 *a*, *b*, *c*) dargestellten Form. Der Preis der Nadeln (6,50 Mk. für Platinnadel oder Platinöse, bei Paul Altmann) ist nur scheinbar hoch, da die Platinkappe unzerstörbar ist, und ein neuer Draht in der Fabrik leicht wieder eingefügt werden kann. Die Einrichtung der Nadeln ist die folgende: In eine Platinkappe ist oben ein Platiniridium-

draht fest eingefügt. Die erwärmte Kappe wird einem oben gerade abgebrochenen, durch Erhitzen in der Flamme nur eben von den scharfen Kanten befreiten, in der Dicke genau passenden Glasstabe aufgesetzt und sitzt dann ganz fest. Die passenden Glasstäbe bestellt man bei der Anschaffung der Kappennadeln gleich mit.

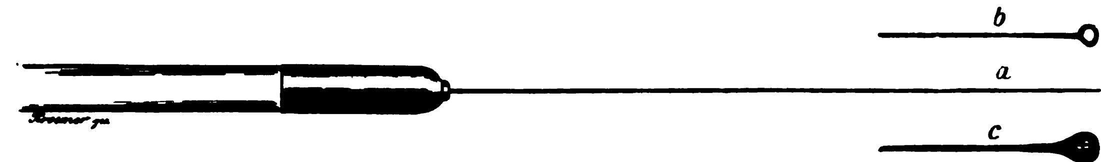


Fig. 16. Kappennadeln nach Arthur Meyer. *a* ohne Öse, *b* mit Öse, *c* mit Spatel.

Die Drähte werden stets vor und nach dem Gebrauche langsam durch die Flamme gezogen; auch der Glasstab (und die Hülse) wird so weit durch die Flamme gezogen, als er in Reagensgläser etc. eingeführt wird. Will man mit den Drähten impfen, so müssen sie stets völlig erkalten, ehe sie benutzt werden, da sonst leicht die Sporen etc. absterben. Nach dem Abglühen legt man die Drähte eventuell einige Augenblicke beiseite, nie aber dürfen sie dabei mit anderen Gegenständen in Berührung kommen, bevor sie gebraucht werden.

Uebung 6.

Herstellung und Beobachtung der Agarstrichkultur und Impfen der Möhrenscheiben.

a. Wir füllen in ein steriles Reagensglas (*a*) $^1/_2$ ccm steriles Wasser und stellen es in das siedende Wasser eines kleinen Wasserbades. Wir öffnen unter Beachtung der Vorsichtsmaßregeln, welche bei Besprechung der Füllung der Reagensgläser mit Agar (Uebung 3) angegeben wurden, das Reagensgläschen, welches eine mindestens acht Tage alte Kultur von Bacillus asterosporus enthält, flammen den Rand des Glases etwas ab, nehmen mit der abgeglühten und wieder völlig erkalteten Platinöse etwas von der Kolonie heraus, die den Agar bedeckt, und spülen die Öse in dem Wasser des Reagensglases *a* ab. Wir schließen die Originalkultur mit dem abgeflammten Baumwollenbausch und stellen sie beiseite. Das Reagensglas *a* stellen wir noch eine Minute in das Wasserbad, um so alle Bakterienstäbchen zu töten, die Sporen keimfähig zurückzubehalten. Wir öffnen ein Reagensglas mit sterilem Agar (ein „Agarröhrchen“), flammen, wie wir das stets thun werden, wenn wir ein derartiges Röhrchen mit oder ohne Kultur zum Gebrauch öffnen, den Hals ab, halten das Reagensglas, wie stets, schräg in der linken Hand, nehmen den Baumwollenpfropf in dieselbe Hand und impfen das Agarröhrchen in folgender Weise. Wir tauchen die sterile, d. h. also die abgeglühte, erkaltete Platinöse in das „abgekochte Sporenmaterial“ des Reagensglases *a* ein und fahren mit ihr von unten nach oben leicht über die Agarfläche hin. Das Agarröhrchen wird hierauf mit dem abgeflammten Baumwollenstopfen (auch das Abflammen des Baumwollenbausches muß stets vor dem Verschließen eines Agarröhrchens etc. erfolgen) verschlossen. Wir

stellen schließlich die Kultur in ein großes Trinkglas, in dem unten etwas Baumwolle liegt, kleben eine Etikette an das Glas und an das Agarröhrchen mit der Aufschrift Bacillus asterosporus und dem Datum der Impfung (es darf niemals ein Röhrchen ohne eine derartige Aufschrift in den Brutschrank gestellt werden) und stellen das Glas in den auf 28° erwärmten Brutschrank. Wir beobachten die Kultur täglich einmal und beschreiben täglich ihr makroskopisches Aussehen.

b. Wir impfen mit dem abgekochten Materiale von Bacillus asterosporus zwei bis drei der sterilen Möhrenscheiben. Dabei beachten wir wieder, daß keine Verunreinigung des Impfmateriales und der Möhrenscheiben durch andere Keime stattfinden darf. Wir öffnen deshalb beim Impfen der Möhrenscheiben den Deckel der Petrischale nur so weit als nöthig, immer beachtend, daß die Luft Keime enthält, die hauptsächlich von oben sich herabsenken. Nach der Beimpfung der Möhrenscheiben stellen wir die Petrischale auf eine umgekehrte, kleine Glasschale und diese auf einen Porzellanteller, gießen so viel Kupfersulfatlösung (25:1000) auf den Teller, daß eine Glasglocke, welche wir über die Petrischale stülpen, unten abgeschlossen ist und stellen die Kultur bei gewöhnlicher Temperatur beiseite. Von Zeit zu Zeit ergänzen wir das aus der Kupfersulfatlösung verdampfende Wasser. Es entwickelt sich eine graue, gallertige Kolonie, welche sich so ausbreitet, daß nach fünf Tagen die Möhrenscheiben von einem dünnen Gallertbelage bedeckt sind, in dem nun Gasblasen auftreten, durch welche die Kolonie eine weißliche Färbung annimmt. Der Spaltpilz löst die Mittellamellen der Möhrenzellen, so daß die Möhrenscheiben nach und nach erweichen. Die Bakterienkultur entwickelt einen angenehmen Geruch. Obgleich Sporen schon nach fünf Tagen entwickelt sind, ist es doch zweckmäßig, denselben, wenn möglich, 14 Tage bis 3 Wochen Zeit zum Ausreifen zu lassen, wenn man gutes Sporenmaterial erzielen will. Wir lassen die Möhrenkulturen, vor Infektion geschützt, stehen, damit wir das Sporenmaterial immer zur Hand haben.

Kapitel VI.

Die Gelatinestichkultur.

Litteratur.

Auerbach, *Ueber die Ursache der Hemmung der Gelatineverflüssigung durch Bakterien durch Zuckerzusatz; Archiv der Hygiene 1897, S. 311. (Ref. Centralbl. f. Bakt. 1898, II. Abt., Bd. IV, No. 11, S. 492.)* — ***Klepzoff,*** *Zur Frage über den Einfluss niederer Temperaturen auf die vegetativen Formen des Bacillus anthracis; Centralbl. f. Bakt. 1895, I. Abt., Bd. XVII, S. 294.* — ***Kuhn,*** *Morphologische Beiträge zur Leichenfäulnis; Archiv für Hygiene 1891, Bd. XIII, S. 40.* — ***Lehmann,*** *1896, II. T., S. 113, S. 57.* — ***Matzuschita,*** *Ueber die Veränderlichkeit der Eigenschaft des Bacillus anthracis Gelatine zu verflüssigen; Centralbl. f. Bakt. 1900, I. Abt., Bd. XXVIII, S. 303.* — ***Migula,*** *1897, S. 253, S. 275.*

Allgemeines über die Gelatinestichkultur.

Nährgelatine ist ein relativ inkonstanter Nährboden, da die in den Handel kommende Gelatine selbst zu verschiedenartig ist. Ihre Verwendung als Nährboden für zu bestimmende Bakterien wird durch dieses Verhältnis oft beschränkt, weiter auch dadurch, daß die Nährgelatine schon bei relativ niedriger Temperatur zerfließt.

Eine Nährgelatine, welche 5 Prozent Gelatine enthält, wird ungefähr bei 22° C., eine solche mit 15 Prozent bei ungefähr 25° C., eine solche mit 25 Prozent Gelatine bei ungefähr 26·5° C. zähflüssig (MIGULA, 1897, S. 253).

10prozentige Gelatine, wie wir sie benutzen, zerfließt ungefähr bei 24° C.

Zur Charakterisierung der Bakterienspezies kann bis zu einem gewissen Grade deren Verhalten in der sogenannten Gelatinestichkultur dienen, doch muß man dabei stets die Inkonstanz der Nährgelatine in Rechnung ziehen und darf denjenigen Erscheinungen, welche von unkontrollierbaren, inkonstanten Verhältnissen abhängig sind, keine Bedeutung beimessen.

Die Gelatinestichkultur wird in folgender Weise angelegt: Der Rand eines frischen Gelatineröhrchens, dessen durch Hinstellen bei nicht zu niedriger Temperatur etwas weiche Gelatinesäule ungefähr 8 cm hoch sein muß, wird nach Entfernung des Baumwollenpfropfens abgehitzt. Hierauf taucht man den sterilen, geraden, steifen, vorn zugespitzten Platindraht etwa 3 cm weit in die die abgekochten Sporen oder das Impfmaterial im allgemeinen enthaltende Flüssigkeit ein oder zieht den Draht etwas über die Agarfläche etc., welche das Material trägt, hin, so daß äußerst wenig Material an einer etwa 3 cm langen Stelle hängen bleibt. Man sticht dann möglichst senkrecht, ohne ein Aufreißen der Gelatinesäule zu veranlassen, in die Gelatinesäule, bis auf den Boden des Reagensglases und zieht den Draht vorsichtig heraus.

Sofort nach dem Impfen darf von dem Stiche mit bloßen Augen nichts zu erkennen sein. Man stellt die Stichkultur bei einer möglichst konstanten Temperatur zwischen 17 und 20° C. beiseite.

Die hauptsächlichsten Erscheinungen, welche an einer solchen Stichkultur zu beobachten sind, sind die folgenden:

1. Das Wachstum der Kolonie findet nur auf der Oberfläche statt (obligat-aerobe Arten), oder auch zugleich mehr oder weniger tief im Stiche (fakultative Anaeroben), oder nur im Stiche, nicht an der Oberfläche (Anaeroben).

2. Die Kolonie im Stiche kann glatt, rauh, perlschnurförmig, knotig, härchentragend, verzweigte Härchen tragend etc. sein, und die Oberflächenkolonie kann ein verschiedenes Aussehen annehmen, ähnlich wie es für die Agarstrichkultur angegeben ist. Alle diese Dinge sind jedoch oft für eine und dieselbe Spezies äußerst wechselnd.

3. Es kann Verflüssigung der Gelatine eintreten oder nicht. Die Form und die Schnelligkeit der Verflüssigung ist wesentlich von der Beschaffenheit der Gelatine abhängig. Je höher die Temperatur ist, je weicher also die Gelatine wird, je schneller findet im allgemeinen eine Verflüssigung der Gelatine statt. Zur Erläuterung diene folgender Versuch MIGULA's (S. 253). Ein Bakterium, welches Gelatine relativ langsam verflüssigte, zeigte folgendes: Bei 22° und 10prozentiger Gelatine begann die Verflüssigung nach einem Tage, bei 22° + 15proz. Gelat. nach 5 T., bei 22° + 20proz. Gelat. nach 9 T., bei 25° + 15proz. Gelat. nach 1 T., bei 25° + 20proz. Gelat. nach 4 T., bei 25° + 25proz. Gelat. nach 7 T.

Im allgemeinen kann man nur Wert darauf legen, ob eine Spezies die Gelatine überhaupt zu verflüssigen vermag oder nicht.

Dabei hat man jedoch noch zu beachten, daß das Verflüssigungsvermögen einer Spezies sehr variieren kann (BEIJERINCK für Leucht-

bakterien; MAX GRUBER und FIRTSCH, Archiv f. Hygiene, Bd. VIII, S. 369; MATZUSCHITA, 1900), und häufig nach längerer Kultur auf künstlichen Nährsubstraten etwas an Energie verliert. KLEPZOW (1895) zeigte, daß das Verflüssigungsvermögen des Milzbrandes durch sieben Tage langes Abkühlen auf ungefähr —30° herabgesetzt wurde. Auch durch Zusätze verschiedener Art zur Gelatine kann die Verflüssigung der letzteren verlangsamt oder beschleunigt werden. So wirkt Phenol etc. verlangsamend (WOOD, Centralbl. für Bakter. Bd. VIII, S. 266); die Bildung des die Gelatine verflüssigenden Fermentes bei fakultativen Anaeroben kann in Wasserstoff und Stickstoff verhindert werden, in Kohlensäure eventuell stattfinden (LEHMANN, S. 37). Zuckerzusatz zur Gelatine beeinflußt die Schnelligkeit der Verflüssigung unter Umständen. KUHN (1891, S. 70) fand für Proteus vulgaris, daß die peptonisierende Eigenschaft des Pilzes durch Zusatz von Dextrose zur Nährgelatine herabgesetzt wird, während das bei Bacillus subtilis nicht der Fall ist. AUERBACH (1897) fand eine Hemmung der Verflüssigung durch Zuckerarten ebenfalls und stellte für Bac. vulgare fest, daß in zuckerhaltiger Bouillon kein proteolytisches Ferment entsteht, wohl aber in zuckerfreier. Man vergleiche auch die Untersuchungen von FERMI, Archiv für Hygiene Bd. X, S. 1; Bd. XII, S. 238; Bd. XIV, S. 1; Centralblatt für Bakteriologie Bd. XII, S. 713; Abth. II, I, S. 482; 1894, S. 830.

4. Es kann Färbung der die Kolonien tragenden Gelatine eintreten.

Uebung 7.

Herstellung der Gelatinestichkultur von Bacillus asterosporus und tumescens.

Wir stellen 1. eine Gelatinestichkultur her mit abgekochtem Sporenmateriale von Bacillus asterosporus. 2. In gleicher Weise verwenden wir abgekochtes Sporenmaterial von Bacillus tumescens. Die Stichkulturen werden bei Zimmertemperatur (17° C.) beiseite gestellt.

Bacillus asterosporus. Für ihn beobachten wir folgendes. Kleine punktförmige Einzelkolonien entwickeln sich langsam von oben nach unten zu im Stiche, zugleich bildet sich eine größere Oberflächenkolonie. Nach zwei bis drei Tagen ist die Entwickelung schon 5—6 cm im Stiche hinabgerückt. Am vierten Tage kann bereits die erste Gasblase in der Gelatine entstehen, und ungefähr am vierten oder fünften Tage wird die Verflüssigung der Gelatine unter der Oberflächenkolonie beginnen.

Wir sehen also, daß der Bacillus facultativ anaerob ist, daß er Gas entwickelt und daß er Gelatine verflüssigt. Die Gelatine färbt sich in der angegebenen Zeit nicht.

Bacillus tumescens. Wir sehen erst nach ungefähr 12 Tagen trichterförmige Verflüssigung der Gelatine eintreten. Nach acht Wochen wird die Gelatine ungefähr 3 cm hoch verflüssigt sein. Am Boden der verflüssigten Gelatine bildet sich ein schleimiger, fadenziehender Bodensatz.

Kapitel VII.

Das Mikroskop und seine Nebenapparate.

Litteratur.

Dippel, *Handbuch der allgemeinen Mikroskopie, zweite Auflage 1882, I. Th., Braunschweig, bei Vieweg und Sohn. Preisliste der optischen Werkstätte von* ***Carl Zeiss*** *in Jena über Mikroskope und mikroskopische Hilfsapparate, 31. Ausgabe 1898, 32. Ausgabe 1902. Preisliste von* ***W. u. H. Seibert,*** *Wetzlar, 30. Ausgabe 1903.* ***A. Zimmermann,*** *Das Mikroskop, Leipzig 1895.* ***Arthur Meyer,*** *Eine Mikroskopierlampe, Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik, 1901, Bd. 18, S. 144—146.*

A. Verzeichnis der von mir benutzten Instrumente.

Wir bedürfen zu unseren Untersuchungen Instrumente von größter Leistungsfähigkeit. Stative und schwächere Objektive von genügender Brauchbarkeit fertigen mehrere optische Institute, aber ein Objektiv von der Leistungsfähigkeit des „Apochromat-Objektivs Homogene Immersion, num. Apert. 1,3, äquiv. Brennweite 2 mm von ZEISS in Jena“ ist mir von keiner anderen Firma bekannt geworden. Dieses System ist für diejenigen, welche auf Grundlage des in diesem Praktikum Gelernten wissenschaftlich weiter arbeiten wollen, kaum zu entbehren. Für das Praktikum selbst kommt man mit der homogenen Immersion $^1/_{12}$ von ZEISS oder von SEIBERT schon allein aus, und deshalb lasse ich neben den Instrumenten von ZEISS auch solche von SEIBERT benutzen, die recht gut sind. Die Immersion $^1/_{12}$ von SEIBERT erreicht fast die von ZEISS und ist nach ZEISS' Instrument die weitaus beste, welche ich kenne.

Ich führe nun die Instrumente an, welche ich in meinem Praktikum benutzen lasse.

Instrumente von CARL ZEISS in Jena.

Stativ IV a. Hartgummitisch von 90 × 60 mm; grobe Einstellung mit Zahn und Trieb, feine durch Mikrometerschraube mit geteiltem Kopfe. Gewöhnlicher Beleuchtungsapparat nach ABBE mit Kondensorsystem von 1,20 mm Apertur und Irisblende; Preis 250 M. (Preisliste 1902, S. 60, No. 74). Revolver für 3 Objektive; Preis 27 M. Objektive: Achromatisches Objektiv A, num. Apertur 0,2, äquiv. Brennweite 18 mm; Preis 24 M. Achromatisches Objektiv E ohne Korr.-Fassung, num. Apertur 0,85, äquiv. Brennweite 2,7 mm; Preis 66 M. Achromatisches Objektiv Homogene Immersion $^1/_{12}$, num. Apertur 2,25, äquiv. Brennweite 2,0 mm; Preis 160 M. Dieses reicht für unsere Arbeiten aus, doch ist das nächstgenannte Apochromat-Objektiv vorzuziehen und sehr zweckmäßig. Wird es angeschafft, so kann das System $^1/_{12}$ wegfallen. Apochromat-Objektiv Homogene Immersion, num. Apertur 1,3, äquiv. Brennweite 2 mm; Preis 300 M. Okulare: HUYGENS'sche Okulare No. 4, Brennweite 25 mm; Preis 7 M. Kompensations-Okulare: No. 4, äquiv. Brennweite 45 mm. No. 8, äquiv. Brennweite 22,5 mm. No. 12, äquiv. Brennweite 15 mm. No. 18, äquiv. Brennweite 10 mm. Immersionsfläschchen und Immersionsöl: Immersionsfläschchen mit breitem Boden ach MACH; Preis 1,50 M. 1 Fläschchen mit Immersionsöl.



Fig. 17. Stativ IVa von C. Zeiss in Jena. (1/2 natürl. Größe).

Instrumente von H. SEIBERT in Wetzlar.

Stativ 4 von SEIBERT 175 M. Revolver für 3 Objektive 20 M. Achromatische Objektive: II, Brennweite 12,5 mm, Apertur 0,26 18 M.; V 1/2, Brennweite 3,2 mm, Apertur 0,90 40 M.; Homog. Immersion 1/12, Brennweite 2 mm, Apertur 1,26—1,30, 100 M. HUYGENS'sche Okulare 1, 2, 3 à 7 M.; Kompensations-Okular No. 4, 8 à 15 M.; No. 12 24 Mk.; No. 18 20 M.

SEIBERT bringt auf Wunsch neben diesen Apparaten zugleich den Zeichenapparat und den beweglichen Objekttisch nach meinen Angaben in dem Mikroskopkasten unter, wie es in Fig. 17 dargestellt ist.

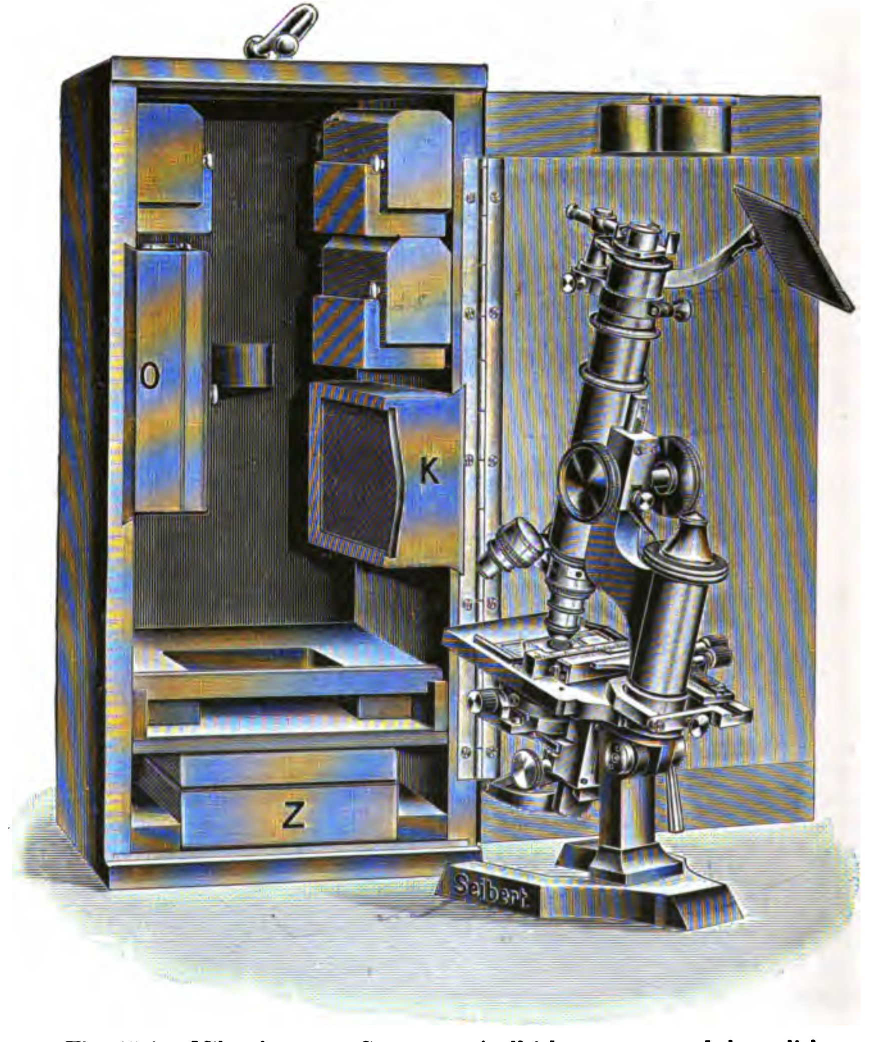


Fig. 17 A. Mikroskop von SEIBERT mit Zeichenapparat und beweglichem Objekttische; im Kasten das Kästchen Z für den Zeichenapparat, O für den Objekttisch, K für andere Nebenapparate.

B. Bemerkungen zu dem Verzeichnisse.

Das Fläschchen nach MACH (Zeitschrift f. wissensch. Mikroskopie 1897, Bd. XIV, S. 348), welches ZEISS verkauft, bietet gegenüber dem zuerst von mir angegebenen ähnlichen Fläschchen (Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 1897, Bd. XIV, S. 174) einige Vorteile.



Fig. 18. Fläschchen mit breitem Boden (1/2 natürl. Grösse).

Das Immersionsöl, welches aus dem ätherischen Öle von Juniperus virginiana von SCHIMMEL u. Co. in Miltitz bei Leipzig ausgezeichnet hergestellt wird, darf nur von ZEISS oder SEIBERT selbst bezogen werden, da in ihrem Brechungsexponenten von dem der betreffenden Öle abweichende Immersionsöle die Leistung der Objektive herabsetzen.

Die Okulare. Die Vergrößerung des HUYGENS'schen Okulares No. 4 von ZEISS beträgt 7, die der Kompensationsokulare ist gleich der Nummer des Okulars. Dabei wird unter Vergrößerung die Zahl verstanden, welche angibt, wieviel Mal ein Okular an dem Tubus von 160 mm Länge die Eigenvergrößerung des Objektivs erhöht. Die HUYGENS-schen Okulare sind nur für die achromatischen Objektive zu verwenden, die Kompensationsokulare für die Apochromatobjektive und für achromatische Objektive, welche mindestens die Apertur 0,85 besitzen, also z. B. schon für Objektiv E und selbstverständlich auch für die homogene Immersion $^1/_{12}$, nicht aber für schwächere achromatische Objektive.

Die Objektive. Bei den Objektiven ist zuerst die numerische Apertur angegeben, da dieselbe einen Ueberblick über wichtige Leistungen der Objektive gestattet. So ist die Helligkeit des Bildes bei gegebener Vergrößerung und unter sonst gleichen Umständen proportional dem Quadrate der Apertur. Wird, wie dies je nach der Natur der Objekte nötig ist, die Irisblende mehr oder weniger geschlossen, so hängt die allgemeine Helligkeit von der Apertur des abgeblendeten Kondensors ab.

Auflösungs- und Definitionsvermögen sind direkt proportional der Größe der Apertur. Für homogene Immersion und für eben noch auf unser Auge wirkendes violettes Licht von 0,0004 mm Wellenlänge berechnet sich die kleinste Entfernung, welche zwei mit einem System bestimmter Apertur beobachtete Linien noch besitzen dürfen, wenn sie getrennt sichtbar sein sollen, folgendermaßen: Auflösungsabstand $= \frac{0{,}0004}{2 \cdot \text{Apertur}}$. Also ist dieser kleinste Abstand

für Immersion $^1/_{12} = 0{,}00016$ mm,

für die Apochromat-Immersion $= 0{,}00015$ mm.

Die höchste Leistungsfähigkeit, welche Instrumente von der jetzigen Konstruktion theoretisch haben können, besteht in der Auflösung zweier 0,00012 mm (0,12 μ) voneinander entfernten Linien, dabei müßte aber Monobromnaphthalin-Immersion und schiefe Beleuchtung benutzt werden.

Die Objektive mit größerer Apertur geben schärfere optische Querschnitte der Objekte, während die Focustiefe dieser Objektive geringer ist als die der Objektive geringerer Apertur.

Aus der Brennweite (B) der Objektive, die ebenfalls angegeben ist, läßt sich die Eigenvergrößerung der Objektive nach der Formel $\frac{250}{B}$ berechnen. Die Eigenvergrößerung ist die Vergrößerung,

welche ein Objektiv, als Lupe gebraucht, auf die Weite des deutlichen Sehens (250 mm) ergeben würde. Die Eigenvergrößerung unserer Objektive wäre danach

ZEISS:

$$\text{Objektiv A} = \frac{250}{18} = 13{,}9$$

$$\text{„ E} = \frac{250}{2{,}7} = 92$$

$$\text{„ } {}^{1}/_{12} = \frac{250}{2} = 125$$

$$\text{A.-Immersion} = \frac{250}{2} = 125$$

SEIBERT:

$$\text{Objektiv I} = \frac{250}{25} = 10$$

$$\text{„ II} = \frac{250}{12{,}5} = 20$$

$$\text{„ V}^{1}/_{2} = \frac{250}{3{,}2} = 78{,}1$$

$$\text{„ } {}^{1}/_{12} = \frac{250}{2} = 125$$

Von Interesse ist ferner die Kenntnis des *Durchmessers des objektiven Sehfeldes*, also der Größe des Objektstückes, welches das ganze Gesichtsfeld gerade ausfüllt, in mm. Den Betrag derselben zeigt die folgende Tabelle.

ZEISS:

	mit HUYGENS Okular 4	mit Komp.-Okular 12
Objektiv A	1,335 mm	
„ E		0,14 mm
„ E	0,21 „	
„ $^{1}/_{12}$		0,10 „
„ $^{1}/_{12}$	0,19 „	
Apochromat-Immersion		0,107 „

SEIBERT:

	mit HUYGENS Okular 1	2	3	mit Kompensationsokular 12
Objektiv I	3,5 mm	2,7 mm	2 mm	
„ II	2,2 mm	1,8 mm	1,2 mm	
„ $V^{1}/_{2}$	0,43 mm	0,35 mm	0,25 mm	0,18 mm
„ $^{1}/_{12}$	0,27 mm	0,19 mm	9,15 mm	0,10 mm

Auch die Verschiedenheit des *freien Objektabstandes* der Objektive ist beachtenswert. ZEISS versteht darunter den Abstand, welcher bei Einstellung auf ein an der unteren Fläche eines 0,15 mm dicken Deckglasses befindliches Objekt zwischen der oberen Fläche dieses Deckglases und der unteren Fläche des Objektivs besteht. Im allgemeinen ist der Objektabstand bei den homogenen Immersionen etwas grösser als bei Trockensystemen gleicher Brennweite. Er beträgt für

ZEISS:

Objektiv A und HUYGENS Okular 2 = 9 mm
Objektiv E und HUYGENS Okular 2 = 0,25 mm
Immersion $^1/_{12}$ und HUYGENS Okular 2 = 0,15 mm
Apochromat-Immersion und Komp.-Okular 4 = 0,14 mm.

SEIBERT:

Objektiv I mit HUYGENS Okular 1 = 13 mm
" II " " " 1 = 8 mm
" V$^1/_2$ " " " 1 = 0,28 mm
" $^1/_{12}$ " " " 1 = 0,16 mm

Man hat sich danach bei Ausführung der Einstellung ungefähr zu richten.

Bei Benutzung des Mikroskopes ist auf die Tubuslänge zu achten. Dieselbe muß für das Instrument von ZEISS 160 mm betragen und zwar von der Ansatzfläche des Objektivgewindes bis zum oberen Tubusrande gerechnet. Bei Benutzung des Revolvers haben wir also den Auszug des Tubus auf die Zahl 150 der Skala des inneren Rohres zu stellen, da der Revolver selbst 10 mm dick ist.

Bei Benutzung der homogenen Immersionen bringt ein Unterschied der Länge des Tubus von 10 mm schon eine merkliche Abnahme der Leistung des Objektivs hervor. Bei SEIBERTschen Mikroskopen ist die Tubuslänge 170 mm. Besitzt das Instrument einen Revolver, so ist dessen Dicke schon in Rechnung gezogen; der Auszug wird also stets auf Teilstrich 17 gestellt. Die richtige Stellung ist auf meine Veranlassung durch einen um das ganze Tubusrohr gehenden Strich markiert.

Wenn man mit Objetiv E arbeitet (im allgemeinen mit D und den darauf folgenden stärkeren Objektiven), so muß man Deckgläser von 0,15—0,20 mm Dicke anwenden; diejenige Deckglasdicke, für welche die vollkommenste Korrektion besteht, ist bei den ZEISS'schen Objektiven übrigens seitlich an der Linsenfassung angegeben. Die Deckglasdicke mißt man genügend genau in folgender Weise. Man stellt auf die Oberfläche des Deckglases und dann auf die untere Fläche des letzteren ein und liest jedesmal die Stellung des Index an dem Schraubenkopfe der Mikrometerschraube ab. Die gefundene scheinbare Dicke des Deckglases multipliziert man mit $^3/_2$ (Brechungsexponent des Glases). Ist das Deckglas sehr dünn, so korrigiert man den Fehler, indem man den Tubus ganz wenig verlängert. Umgekehrt erhält man bei zu dickem Deckglase die volle Leistung des Systems, wenn man den Tubus um eine entsprechende Kleinigkeit verkürzt.

Die Objektive für homogene Immersion sind in weiteren Grenzen in ihrer Leistung unabhängig von der Deckglasdicke, so daß man dünne Deckgläser ohne weiteres verwenden darf.

Zuletzt gebe ich noch eine Tabelle über die Vergrößerung der Bilder, welche man beim Zeichnen mit unserem Zeichenapparate erhält, wenn man das Papier auf den Zeichenklotz, der im Kapitel IX beschrieben ist, auflegt und die Tubuslänge genau auf 160 mm bringt.

ZEISS:

Objektiv	HUYGENS Okular	Kompensations-Okular			
	4	4	8	12	18
A	150	—	—	—	—
E	937,5	600	1167	1600	—
$^1/_{12}$ (Ap. 1,25)	1428,5	835	1600	2300	3200
Apochr.-Imm. 1,3·2,0	—	835	1600	2300	3200

SEIBERT:

	HUYGENS'sche Okulare			Kompensations-Okular			
	1	2	3	4	8	12	18
II	104	140	196				
V 1/2	490	660	940	435	800	1250	1760
1/12	860	1200	1500	990	1700	2500	3300

C. Die Anwendung des Mikroskopes.

Ich setze voraus, daß der Praktikant, welcher diese Anleitung benutzt, mit der Anwendung des einfacheren Mikroskops, wie man es Anfängern in die Hände zu geben pflegt, und wie ich es in meinem Ersten mikroskopischen Praktikum auf S. 4 beschrieben habe, vertraut ist. In dem Folgenden soll deshalb nur eine Anleitung zum Gebrauche des ABBE'schen Beleuchtungsapparates, der Lichtquellen und der Immersionssysteme gegeben werden, mit Rücksicht auf die Benutzung dieser Hilfsmittel bei der mikroskopischen Untersuchung kleinster Objekte.

Uebung 8.

Der ABBE'sche Beleuchtungsapparat.

Der Apparat (Fig. 19) besteht aus zwei oder drei Linsen, welche zu einem großen Objektivsysteme, „Kondensorsysteme", zusammengestellt sind, dessen Vorderlinse mehr als halbkugelig und plankonvex ist. Die ebene Fläche der oberen Linse liegt fast genau in der Fläche des Objekttisches. Die numerische Apertur des Kondensorsystemes beträgt 1,2 mm. Der obere Brennpunkt befindet sich ungefähr 2 mm über der ebenen Fläche der oberen Linse des Kondensorsystemes.

Damit man bei dünnem Objektträger den Brennpunkt in die Objektebene bringen kann, den Brennpunkt überhaupt beliebig weiter senken kann, ist der ganze Apparat an einer Zahnstange vertikal verschiebbar.

Unter dem Kondensorsystem ist die Irisblende angebracht, tiefer unten der Doppelspiegel.

Um uns mit dem Apparate etwas vertraut zu machen, betrachten und untersuchen wir denselben vorsichtig in folgender Weise. Wir entfernen zuerst die Objektive und das Okular von dem Mikroskope, fassen unten den Fuß des Mikroskopes fest und oben die Prismensäule und biegen das ganze Oberteil des Mikroskopes vorsichtig zurück. — Wir stellen das Instrument dann so vor uns, daß der Spiegel von uns weg, der Mikroskoptubus nach uns zugekehrt ist. Hierauf schrauben wir durch Drehen des links seitlich sitzenden Schraubenkopfes (*s*) den ganzen Beleuchtungsapparat etwas abwärts, um uns denselben genau ansehen zu können. Oben sehen wir also zuerst das Kondensorsystem, welches man übrigens, nach Zurückschlagen der Blendeneinrichtung, nach unten zu aus dem dasselbe tragenden Ringe heraus-

ziehen kann. Wir untersuchen nun die Blendeneinrichtung. Wir sehen links an derselben eine kleine Einschnappvorrichtung, welche die Einrichtung etwas feststellt und leicht durch vorsichtiges Ziehen an dem Schraubenkopf gelöst werden kann. Wir fassen den Schraubenkopf, drehen ihn ein wenig nach vorn und ziehen leicht daran, um so die Blendenvorrichtung herauszuklappen. Der wichtigste Teil der letzteren ist die Irisblende, welche sich durch den kleinen Griff *p* öffnen und schließen läßt. Beim Schließen hüte man sich, zuletzt zu stark zu drücken. Auf dem oberen Rande des Blendenringes findet sich eine Teilung von 0 bis 10, welche angiebt, wie viel Zehntel des Durchmessers der ganzen Blende der Durchmesser der eingestellten Öffnung beträgt. Das Zahnrad dient dazu, die Blende vor- und rückwärts zu verschieben, so daß man ein außeraxiales Strahlenbündel allein zur Wirkung gelangen lassen kann. Der Blendenträger ist um die optische Achse drehbar. Die Drehung geschieht, indem man den großen Knopf um die Blende herumführt. So kann man auch schiefes Licht in allen Richtungen zur Achse wirken lassen. Zuletzt betrachten wir den Doppelspiegel und beachten die Art der Beweglichkeit desselben.

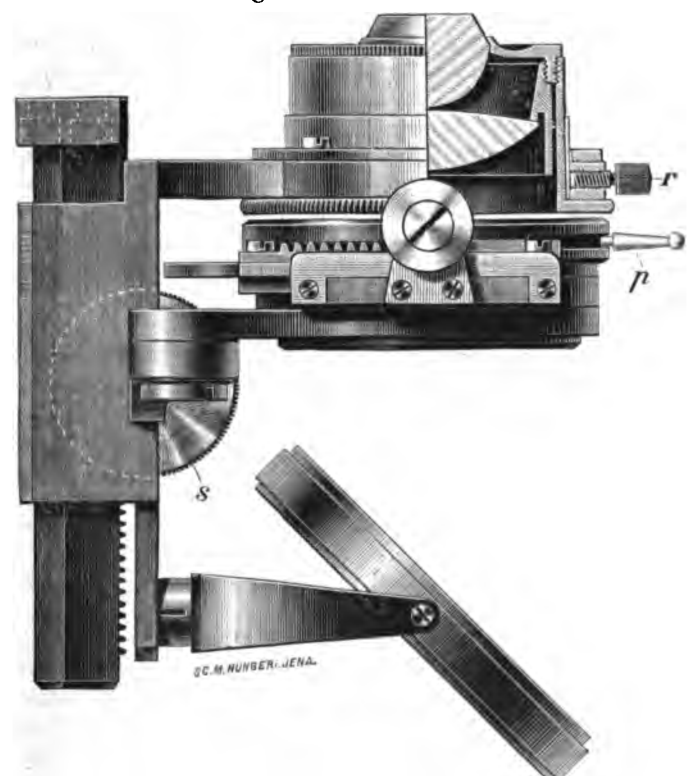


Fig. 19. Beleuchtungsapparat nach ABBE, mit Kondensorsystem No. 25, von CARL ZEISS in Jena.

a. Die homogenen Immersionssysteme und ihre Behandlung.

Bei Benutzung der Immersionssysteme hat man zwischen die Frontlinse des Systemes und das dünne Deckglas ein Tröpfchen Immersionsöl zu bringen. Man setzt ein sehr kleines Tröpfchen des Öles

auf das Deckglas selbst auf und senkt dann die Linse vorsichtig auf das Öl hinab. Dabei dürfen keine Luftbläschen im Öle vorhanden sein oder in dasselbe hineingedrückt werden. Um letzteres zu verhindern, kann man auch vorsichtig ein keines Tröpfchen Öl, vor dem Einsenken in das Tröpfchen auf dem Deckglase, an die Frontlinse bringen.

Die Einstellung mit den Immersionslinsen hat äußerst vorsichtig zu erfolgen, damit die Fassung der Frontlinse durch Aufpressen derselben auf das Deckglas nicht verändert wird. Es ist zweckmäßig, bei feinen Objekten stets erst das schwächste Okular (Kompensationsokular 4) zur Einstellung zu verwenden, dann erst mit den stärkeren Okularen zu beobachten.

b. Die Lichtquellen und ihre Verwendung.

Bei Benutzung der homogenen Immersionen zur Untersuchung sehr kleiner und schwierig zu erforschender Objekte ist es sehr wichtig, daß die Lichtquelle zweckmäßig gewählt und zweckmäßig verwendet wird.

Als beste Lichtquelle ist das von einer hell beleuchteten Wolke zurückgeworfene Tageslicht zu bezeichnen, und man muß sich zur Untersuchung der kleinsten Objekte, vorzüglich auch zur Feststellung der Farbe solcher Objekte, stets dieser Lichtquelle bedienen. Handelt es sich um letzteren Zweck, so ist zugleich die Verwendung der Apochromatobjektive äußerst zweckmäßig. Handelt es sich um maximale Ausnutzung des Beleuchtungsapparates und der Leistungsfähigkeit der Immersionen, so hat man ferner darauf zu achten, daß die den Spiegel bedienende weiße Wolkenfläche eine genügend große Ausdehnung hat. Man hat also zuerst der freien Fensteröffnung eine genügende Größe zu geben oder sich derselben genügend zu nähern. Die Höhe der quadratischen Fensteröffnung, durch welche die weiße Himmelsfläche vom Mikroskop aus völlig sichtbar ist, muß mindestens ungefähr so groß sein wie die Entfernung zwischen Mikroskop und Fenster.

Gegen Stoß und Hinfallenlassen sind die Immersionssysteme äußerst empfindlich. Sollte irgend eine Verschlechterung des Bildes eintreten, welches die Linsen liefern, so darf an den Linsen keine Operation vorgenommen werden, um den Fehler zu verbessern, vielmehr müssen sie sofort der Fabrik eingesandt werden, welche den Fehler meist leicht beseitigen kann. Nur daraufhin hat man eventuell zu prüfen, ob die Vorderfläche der Frontlinse rein ist. Man betrachtet zu dem Zwecke die Fläche genau mit der Lupe. Hie und da kommt es auch vor, daß etwas schwarzer Lack auf die hintere Linse des Systemes fällt, der dann das Bild trübt. Man kann ihn sehr vorsichtig mittelst eines neuen, reinen, zarten Marderpinsels entfernen.

Nach dem Gebrauche sind die Immersionssysteme stets in ihre Kapsel zu stecken. Vor der Aufbewahrung muß die Linse vollständig vom Immersionsöle befreit werden. Man wischt zuerst das Öl an einer kleinen Stelle mittelst eines Stückchens reinen Fensterleders leicht ab, darauf befeuchtet man eine kleine, reine Stelle des Leders mittelst des Pinsels mit einer Spur Benzin und wischt damit nochmals die Linse leicht ab. Zuletzt wischt man nochmals mit dem trockenen Leder nach.

Das Stückchen Fensterleder bewahrt man stets in einer reinen Schachtel auf. Das Benzin befindet sich in einem Gläschen, in dessen gut schließendem Korkstöpsel ein kleiner Pinsel eingefügt ist.

Steht kein gutes Tageslicht zur Verfügung, so verwendet man am besten die von mir konstruierte Mikroskopierlampe (ARTHUR MEYER 1901).

Als Lichtquelle benutze ich eine kleine Gasglühlampe mit Auerschem Glühstrumpfe, da der kleine Brenner weniger Gas kostet, weniger wärmt und in der Lampe doch noch eine hinreichende Lichtintensität liefert. Den Glühkörper stelle ich in den Brennpunkt eines parabolischen Spiegels (*P* Fig. 20), welcher mit der Lampe auf einem Dreifuße befestigt ist. Der Spiegel macht die Lichtstrahlen annähernd

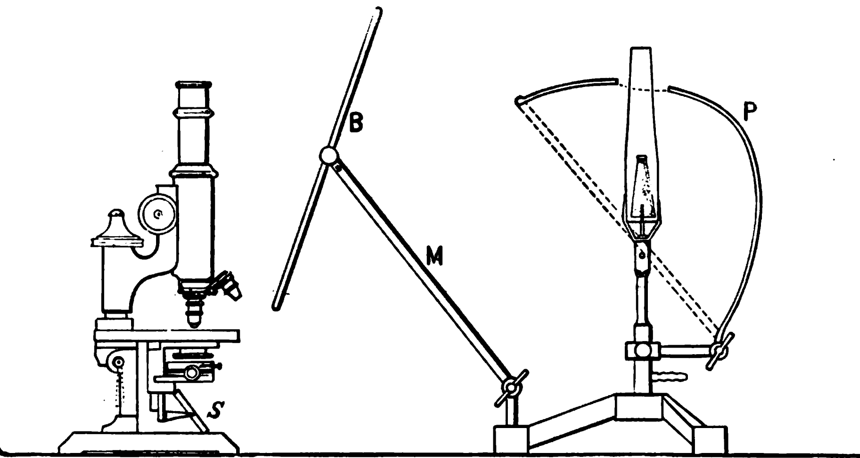


Fig. 20. Mikroskopierlampe nach ARTHUR MEYER.

parallel und wirft sie auf eine matte Glasscheibe (M), welche ein sehr feines Korn besitzt, einen Teil der Strahlen, ohne deren Richtung zu ändern, einen andern Teil zerstreut austreten läßt. In einer Entfernung von ungefähr 25 cm vom Fuße der Lampe, bei Benutzung der stärksten Systeme, oder ungefähr bis 35 cm bei Anwendung schwacher Systeme, wird das Mikroskop aufgestellt, dessen Spiegel (S) das Licht aufnimmt. Der Schirm *B* schützt die Augen gegen das direkte Licht der Lampe. Die Lampe ist von W. u. H. SEIBERT in Wetzlar für 40 Mk. zu beziehen.

Zu beachten ist bei Benutzung der Lampe, daß die leuchtende Stelle des gut glühenden Glühstrumpfes im Brennpunkte des Spiegels stehen muß. Der Spiegel ist zum Höher- und Tieferstellen eingerichtet. Ferner darf keine beliebige Mattscheibe für die Lampe benutzt werden, da das Korn der Scheibe von großer Bedeutung für die Leistung der Lampe ist. Der Neusilberspiegel hält seine Politur sehr gut; sollte er durch unrichtige Behandlung sich trüben, so kann man ihn mittelst eines trockenen, mit etwas Wiener Kalk eingeriebenen Fensterleders leicht wieder blank putzen.

In allen Fällen, sowohl bei Benutzung des Himmelslichtes als der Mikroskopierlampe, prüft man auf die genügende Größe und Gleichmäßigkeit der Lichtquelle in folgender Weise. Man entfernt das Kondensorsystem des Beleuchtungsapparates, ebenso Objektiv und Okular und sieht durch den Tubus nach dem richtig eingestellten Planspiegel. Derselbe muß seiner ganzen Fläche nach gleichmäßig hell erleuchtet sein.

Hat man die Beleuchtungsmittel im allgemeinen zweckmäßig eingerichtet, so ist es gut, vor der Beobachtung der Objekte erst zu prüfen, ob die Beleuchtung des Objektes durch den Spiegel etc. nun auch eine gute ist. Zu dem Zwecke stellt man das Mikroskop auf das durchsichtige Objekt ein, entfernt hierauf das Okular und sieht in den Tubus hinein. Man erkennt dann, etwas vom Objektive entfernt, ein Bild der Lichtquelle und kann an diesem erkennen, ob man auf eine genügend helle und gleichmäßige Stelle der Lichtquelle eingestellt hat, und danach auch durch Drehen des Spiegels die beste Beleuchtung, die möglich ist, leicht finden.

Ferner handelt es sich bei unseren Untersuchungen auch um eine zweckmäßige Benutzung des ABBE'schen Beleuchtungsapparates.

Der Apparat liefert, wenn man den Objektträger auf die Oberfläche der Frontlinse des Kondensorsystems ohne weiteres auflegt, einen Beleuchtungskegel, dessen Oeffnungswinkel dem doppelten Werte des Grenzwinkels zwischen Luft und Glas entsprechen würde, also dem Werte 82°. Dieser Beleuchtungskegel genügt für alle Trockensysteme, da diese ja doch keinen weiteren Strahlenkegel aufnehmen können, ebenso würde dieser Beleuchtungskegel die maximale Wirkung bei Präparaten ausüben, welche trocken, ohne Einschlußmittel, beobachtet werden. selbst wenn die Immersionssysteme Verwendung fänden. Bei Benutzung der homogenen Immersionen und Anwendung von Wasser als Einschlußmittel für die Objekte, würde es zur vollen Ausnutzung der Immersionen nötig sein, zwischen die Frontlinse des Kondensorsystems und den Objektträger ein Tröpfchen Wasser zu bringen. Hierdurch würde der Beleuchtungskegel des Kondensors einen Öffnungswinkel von 122° (doppelter Grenzwinkel zwischen Wasser und Glas) erhalten. Statt des Wassers wendet man vorteilhaft ein Tröpfchen Glycerin an, mit dem man fast für alle Zwecke ausreicht.

Hat man in Kanadabalsam eingelegte Objekte mit Immersion genau zu beobachten, so bringt man eventuell zwischen die Frontlinse des Kondensorsystems und den Objektträger etwas Immersionsöl.

In denjenigen Fällen, in denen es darauf ankommt, möglichst nur die gefärbten Stellen eines Präparates scharf und klar mittelst der Immersionssysteme zur Beobachtung zu bringen, mögen die gefärbten Objekte in Wasser oder Kanadabalsam liegen. ist es vorteilhaft, die Blende des Beleuchtungsapparates recht w e i t zu öffnen. Man schließt bei Beobachtung solcher Objekte jedoch trotzdem die Blende zuerst fast völlig und öffnet sie dann langsam, um den besten Stand der Blende festzustellen. Sollen an farblosen Objekten, z. B. an ungefärbten Bakterien oder Sporen, die durch Brechungsdifferenzen bewirkten Grenzlinien oder innere, feine Strukturen erkannt werden, so ist die B e n u t z u n g d e r B l e n d e v o n g r ö ß t e r W i c h t i g k e i t. Man schließt auch hier zuerst die Blende und öffnet sie langsam, um die beste Öffnungsweite der Blende auszuprobieren.

Uebung 9.

Benutzung der Blende.

Um uns mit der Benutzung der Blende vertraut zu machen, stellen wir uns ein Präparat von den fettführenden Stäbchen einer jugendlichen Kultur von Bacillus tumescens in Wasser her und be-

obachten dieses Präparat mit der homogenen Immersion $^1/_{12}$ genau, darauf achtend, bei welcher Blendenstellung die Fetttropfen am schärfsten hervortreten, überhaupt das Bild am besten ist. Wir zeichnen das Bild in der weiter unten erläuterten Weise mit dem Zeichenapparate. Hierauf prüfen wir den Stand der Blende, lesen also ab, wie groß der Durchmesser der gebrauchten Blendenöffnungen, in $^1/_{10}$ des ganzen Blendendurchmessers ausgedrückt, war. In gleicher Weise prüfen wir das Objektiv *E*.

Bei gutem Tageslichte und bei Benutzung des Planspiegels liefern die Linsen von Zeiss bei ungefähr folgenden Blendenweiten in diesem Falle die besten Bilder:

Objektiv *A* = 0,2
Objektiv *E* = 0,2
Homogene Immersion $^1/_{12}$ = 0,4
Apochrom. Immersion = 0,4.

Kapitel VIII.

Der kleine (aufsetzbare) bewegliche Objekttisch.

Der wohl zuerst von C. Reichert in Wien gut durchgebildete und von Fleischl, von Marxow (Zeitschrift f. wissensch. Mikroskopie 1887, Bd. IV, S. 25; siehe auch ebenda 1885, S. 289) beschriebene,

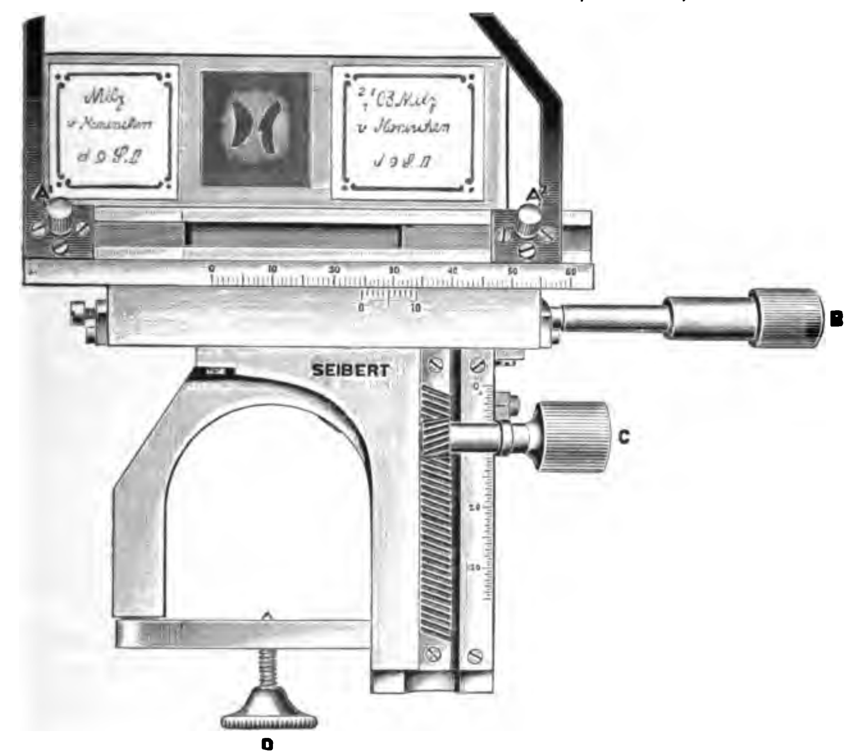


Fig. 21. Kleiner beweglicher Objekttisch (Seibert's Modell).

aufsetzbare Objekttisch wird von Zeiss (No. 64, 90 Mk.) und Seibert (No. 56, Katalog 1902, 70 Mk.) in guter Ausführung geliefert. Der bewegliche Objekttisch (Fig. 21) wird in folgender Weise an dem Stative angebracht. Nachdem man durch den Triebknopf *C* den Schlitten so weit nach vorn bewegt hat, daß der Bügel an seinem rechten Ende nicht mehr vom Schlitten bedeckt ist, dreht man das Zahnrad *C* etwas zurück, schlägt den Bügel nach links, schraubt den Tubus des Mikroskopes hoch, um Spielraum zu erlangen und schiebt den Tisch von vorn nach hinten auf. Hierauf schlägt man den Bügel nach rechts zurück, drückt ihn völlig hinunter, da er sonst den Schlitten, welcher durch das Zahnrad *B* bewegt wird, hemmt, dreht den Schlitten ganz zurück und zieht nun die Schraube am Bügel an, für deren Spitze man an der Stelle, wo sich das durch die Schraube eingedrückte Loch befindet, am besten ein kleines Loch durch den Mechaniker einbohren läßt. Um verschiedene Objektträger an demselben Apparate benutzen zu können, sind die seitlichen Arme *A* für sich in einem Schlitten beweglich und können in der für die betreffende Größe des Objektträgers geeigneten Stellung festgestellt werden.

Der Objektträger wird nun zwischen die Halter A^1 und A^2 geklemmt und kann dann durch die Triebknöpfe *B* und *C* nach vor- und rückwärts und nach rechts und links bewegt werden.

Der Tisch dient zuerst zum bequemen Beobachten kleiner Objekte, die durch die Bewegung des Objektträgers mit der Hand leicht aus dem Gesichtsfelde verschoben werden können. Ferner benutzt man ihn zum sorgfältigen Absuchen von Präparaten auf bestimmte Objekte, z. B. von Geißelpräparaten auf gute Geißeln. Man stellt zu dem Zwecke die linke Ecke des Präparates ein, führt mittelst der Schraube *B* das ganze Objekt durch das Sehfeld, schiebt dann mittelst der Schraube *C* das Präparat um die Breite eines Sehfeldes von sich weg, benutzt wiederum die Schraube *B* u. s. w. Ferner soll der Tisch zum Wiederauffinden beobachteter Objekte dienen. Man klemmt zu dem Zwecke den in der linken Ecke unten mit einem Kreuze bezeichneten, das Objekt tragenden Objektträger in den Tisch, mit dem Kreuze unten links, ein, stellt das Objekt mit einem möglichst starken Objektive genau ein, liest hierauf an beiden Nonien die Stellung der Nullpunkte auf den Skalen ab und notiert sie auf der Etikette des Präparates. Will man das Objekt wieder aufsuchen, so stellt man die Nullpunkte wieder genau ein, sucht dann mit einem möglichst schwachen Objektive das Objekt auf und stellt es hierauf genau in die Mitte des Sehfeldes dieses Objektives. Man vertauscht dann das schwache Objektiv gegen das zur Untersuchung des Objektes notwendige.

Kapitel IX.
Zeichenapparat, Zeichenklotz und Objektmikrometer.

A. Der Abbe'sche Zeichenapparat.

Litteratur.

Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, Bd. 11, S. 289, 1894. ***Arthur Meyer,*** *1898.*

Wir bedürfen zu unseren Arbeiten mit den kleinsten Organismen eines sehr guten Zeichenapparates, welcher eine leichte und sorgfältige Regulierung der Helligkeit des Bleistift- und des Objektbildes zuläßt. Ich empfehle für unsere Arbeiten den Apparat Nr. 44a von Zeiss (60 Mk.), der auch in guter Ausführung von Seibert (Mk. 54) geliefert wird. Der Apparat Nr. 44 von Zeiss ist wegen seiner unpraktischen Befestigungsweise nicht zu empfehlen. Bezüglich der Erklärung der Wirkungsweise des Zeichenapparates im allgemeinen verweise ich auf mein Erstes mikroskopisches Praktikum (1898, S. 68) und bemerke dazu nur noch folgendes:

Die Helligkeit des Bleistiftbildes wird durch die drehbare Kappe *R* (Fig. 22), die des Objektbildes durch die Scheibe *B* reguliert. Es sind zwei Prismen (*P*) beigegeben, von denen dasjenige mit 1 mm großem Loche gewöhnlich gebraucht wird, das mit 2 mm großem Loche für schwache Vergrößerungen bestimmt ist. Beide sind leicht einzuschieben. Die Lochöffnung des Prismas kann durch die Schrauben *H* und *L* zentriert werden.

Man dreht zum Zwecke des Zentrierens die Blende relativ weit zu und sieht durch das Loch des Zeichenapparates. Ist das Sehfeld nicht frei, oder reicht der rotbraune Rand, der das Sehfeld außen ringsum etwas decken kann, an einer Stelle besonders weit in das Sehfeld hinein, so dreht man die Schrauben in entsprechender Weise, bis das Sehfeld so weit wie möglich frei wird.

Ob die Öffnung des Prismas in richtiger Höhe über einem Okular liegt, erkennt man in folgender Weise. Man dreht die Blende des Beleuchtungsapparates ziemlich weit zu, stellt den Spiegel ein und sieht aus deutlicher Sehweite auf das Okular hinab. Man sieht dann das von dem Okulare entworfene Bild der freien Objektivöffnung als helles Scheibchen über dem Okulare schweben. Mit diesem Scheibchen muß das Loch im Prisma zusammenfallen. Stellt man richtig ein, so zeigt der helle Kreis gegenüber der Prismenöffnung keine Bewegung, wenn man aus der deutlichen Sehweite von oben auf die Prismenöffnung sieht und den Kopf seitlich hin und her bewegt.

Zu beachten ist, daß der Zeichenapparat verzerrt, wenn die Verbindungslinie der Spiegelmitte mit der Ebene der Zeichnung nicht auf letzterer senkrecht steht.

Die Bilddistanz, welche die Vergrößerung mit bedingt, setzt sich zusammen aus der Entfernung der Prismenmitte von der Spiegelachse und der Entfernung der letzteren vom Papiere.

B. Der Objektmikrometer.

Wir benutzen den Objektmikrometer von Zeiss, welcher einen in $^1/_{100}$ mm geteilten, in Glas eingeritzten, geschwärzten und mit einem

angekitteten Deckglase versehenen Maßstab trägt (Preis 10 Mk.). Siehe hierzu ARTHUR MEYER 1898, S. 70.

C. Der Zeichenklotz.

Würden wir die Zeichnungen auf dem Tische zu entwerfen versuchen, so würden die meisten von uns die Bleistiftspitze nicht mehr deutlich erkennen können. Wir legen deshalb rechts neben das Mikroskop einen Klotz aus Lindenholz, welcher 25 cm lang, 15 cm breit und 6,5 cm hoch ist und befestigen unser Zeichenpapier auf dessen Oberfläche.

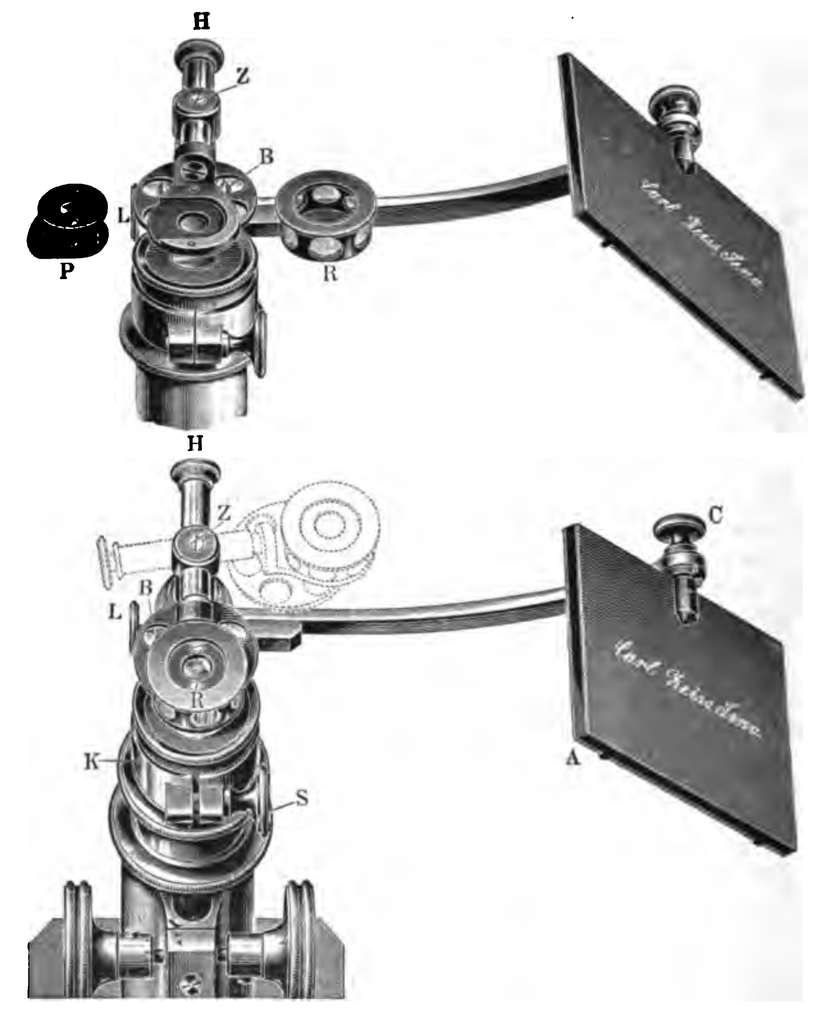


Fig. 22. Zeichenapparat nach ABBE von Zeiss, $^2/_3$ natürl. Grösse.

Uebung 10.

Uebung mit dem Zeichenapparate.

Wir montieren das Mikroskop mit der homogenen Immersion $^1/_{12}$ und dem Kompensationsokular 12, dessen Kappe wir abnehmen und

setzen den Zeichenapparat so auf, daß der obere Rand von dessen Klemmringe mit dem Rande des Tubus zusammenfällt, also in richtiger Stellung steht. Wir legen auf die Fläche des Zeichenklotzes ein Stück guten, weissen Zeichenkarton, befestigen ihn mit ein paar Reißzwecken, legen den Objektmikrometer unter das System und stellen genau ein. Hierauf setzen wir die Spitze des genügend harten, guten, fein gespitzten Bleistiftes (z. B. Kohinor HHH) auf das Zeichenpapier genau unter die Mitte des Spiegels und regulieren nun durch die Rauchgläser die Helligkeit des Bleistiftbildes, eventuell auch die des Objektbildes. Dabei achten wir darauf, daß unsere Bilder beide die größtmöglichste Helligkeit zeigen.

Ist der Bleistift und das Bild des Maßstabes gut zu sehen, so zeichnen wir die Striche des Maßstabes sauber auf, kopieren uns dann die mittlere Länge des Stückes zwischen zwei Teilstrichen ($^1/_{100}$ mm Länge) auf das Papier und teilen sie genau in zehn Theile, so daß wir einen Mikromillimeter-Maßstab erhalten. Zugleich stellen wir die Stärke der Vergrößerung fest (für Objektiv $^1/_{12}$, für Okular 12 und die angegebene Entfernung ungefähr 2300).

Wir stellen nun ferner in gleicher Weise eine Zeichnung nach einem Präparate lebender, in Nährlösung liegender Sporangien von Bacillus asterosporus her, die wir, mit einem Schleimflöckchen, einer Kultur des Spaltpilzes in Nährlösung I entnehmen. Wir achten dabei darauf, daß der Bleistift möglichst fein gespitzt ist, und daß die Konturen des Bildes äußerst genau nachgezogen werden. Die äußerste Kontur des Bleistiftstriches soll mit der äußersten Kontur des betreffenden Bildes zusammenfallen. Hierauf nehmen wir das Zeichenpapier von dem Klotze und führen die Zeichnung sorgfältig aus. Ist das Bild fertig, so vergleichen wir es nochmals sorgfältig mit dem Originale, indem wir es nochmals auf den Klotz legen und in Deckung mit dem Objektbilde bringen. Die Konturen des gezeichneten Bildes müssen dann in der angegebenen Weise mit den Konturen des mikroskopischen Bildes zusammenfallen. Nachdem die Zeichnung fertig ist, stellen wir die Dicke und Länge des Sporangiums und der Spore, welche im Sporangium liegt, mittelst des Maßstabes fest. In gleicher Weise zeichnen wir eventuell ein gutes Geißelpräparat von Bacillus subtilis. Die Herstellung exakter Zeichnungen der Bakterienmorphoden ist für die Speziesbestimmung von großer Bedeutung und muß deshalb besonders geübt werden.

Kapitel X.

Reinzüchtung der auf Möhren vorkommenden Bakterien und die Trennungsmethoden.

Uebung 11.

Gewinnung einiger meist aus dem Erdboden stammenden, auf Möhren sitzenden, sporenbildenden Spezies.

Eine möglichst dicke, ausgereifte Mohrrübe wird unter der Wasserleitung gut abgewaschen, der Länge nach mit einem vorher durch die

Flamme gezogenen Küchenmesser halbiert und die Hälfte dann in 5 cm lange Stücke geschnitten. Die Stücke werden auf die Messerspitze gesteckt, einzeln in eine Schale mit vorher zum Sieden erhitzten Brunnenwasser 2 Minuten eingetaucht, um alle Organismen mit Ausnahme der Bakteriensporen abzutöten, und dann alle zusammen in eine sterile Glasschale gelegt, welche auf einem Teller steht, der mit Kupfersulfatlösung angefüllt ist. Die Kupfersulfatlösung ist zum Abhalten der aus der Luft einfallenden Sporen bestimmt und muß durch Zusatz von Wasser von Zeit zu Zeit wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht werden. Die Schale wird durch eine mit Kupfersulfatlösung ausgespülte Glasglocke bedeckt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 2 bis 3 Tagen findet man auf den Möhrenstücken gallertartige Kolonien. Dieselben sind aus verschiedenen einzeln oder wenigen dicht beieinander liegenden Sporen erwachsen, welche der Tötung durch das Erhitzen entgingen, und können, hauptsächlich wenn sie von verschiedenen Spezies herrühren, verschiedenartig aussehen. Wir wählen je eine kleinste von jeder Art der Kolonien aus und impfen davon etwas mit dem sterilen Platindrahte auf je eine sterile, in einer Petrischale liegende Möhrenscheibe. Die Petrischalen stellen wir dann auf einen Teller und aufeinander und bedecken sie mit einer Glasglocke. Nach 14 Tagen untersuchen wir die Möhrenscheiben darauf hin, ob Sporen in den Kolonien gebildet worden sind, indem wir mit der sterilen Platinöse ganz wenig von der Kolonie auf einen Objektträger bringen und nach Auflegen des Deckglases mittelst des Systemes E betrachten. Wenn Sporen vorhanden sind, so bringen wir von jeder verschiedenartig erscheinenden Kolonie eine Öse voll Sporenmaterial unter den gleich zu lehrenden Vorsichtsmaßregeln in ein steriles Reagensglas, welches 5 ccm Nährlösung I enthält, und mischen sie nach Aufsetzen des Baumwollenbausches. Wenn das Sporenmaterial zähe ist, so zerreiben wir es mit der Öse auf der Innenwand des Reagensglases. Nun erhitzen wir das mit dem sterilen Wattebausche verschlossene Röhrchen 2 Minuten im siedenden Wasserbade. Diese Mischung bezeichnen wir als die Verdünnung I des Sporenmaterials. So haben wir nun allein Sporenmaterial in dem Gläschen, jedoch ist es fraglich, ob dasselbe von e i n e r Spezies abstammt, da sehr wohl zwei Sporen von verschiedenen Spezies auf der Möhre dicht nebeneinander gelegen haben könnten und zu einer aus zwei Spezies gemischten Kolonie erwachsen sein könnten. Um die Spezies nun sicher rein zu erhalten, wenden wir auf das Sporenmaterial einer jeden Kolonie zuerst Koch's Methode zur Isolierung der Spezies aus Speziesgemengen an.

Gelatineplatten. Wir stellen drei sterile, nicht über 1 cm hohe Petrischalen nebeneinander auf den Tisch. Wir entzünden eine Bunsenflamme, legen die abgehitze Platinöse bereit und stellen ein niedriges Trinkglas mit etwas Brunnenwasser daneben. In drei Reagensgläsern, welche je 5 ccm Nährgelatine enthalten, schmelzen wir letztere durch Einstellen in ein Wasserbad von 40° bis 100° und lassen sie dann bis zur Handwärme abkühlen. Hierauf sengen wir den Wattepfropfen des die Verdünnung I enthaltenden Glases und des Gelatineröhrchens etwas in der Flamme ab, um anhängenden Staub zu entfernen. Wir halten das Glas mit der Verdünnung I möglichst wagrecht in der linken Hand, um das Hineinfallen von Organismen aus der Luft zu vermeiden, und entfernen die Watte, die wir dann zwischen Mittel-

finger und Goldfinger der linken Hand so fassen, daß wir den unteren Teil der Watte nicht berühren; hierauf erhitzen wir den Rand des Reagensröhrchens, unter Drehen des letzteren um seine Achse, so in der Flamme, daß dort alle Organismen absterben müssen, nehmen nun den Wattebausch des ersten Gelatineröhrchens ab und zwischen den kleinen Finger und den Goldfinger der linken Hand und hitzen auch den Rand des Gelatineröhrchens ab. Letzteres stellen wir dann in ein niedriges Trinkglas, so daß es etwas schräg steht.

Wir tauchen nun die Platinöse etwas tief in die Verdünnung I ein und mischen das Herausgenommene mit der geschmolzenen Gelatine des im Glase stehenden Reagensrohres. Nach Aufsetzen des Wattepfropfens schwenken wir tüchtig um, ohne die Watte zu befeuchten. Die Verdünnung I haben wir nun nicht mehr nötig.

Von der Verdünnung II stellen wir in gleicher Weise unter Benutzung eines weiteren Gelatineröhrchens die Verdünnung III und von dieser die Verdünnung IV her.

So haben wir dann drei Reagensgläser mit geschmolzener Gelatine, in welchen sich die Sporen in sehr verschiedener Menge finden.

Wir gießen nun die Verdünnungen II, III, IV in dünner, höchstens 2 mm dicker Schicht in die drei Petrischalen aus. Es geschieht das in der Weise, daß wir zuerst das Röhrchen, welches wir ausgießen wollen, öffnen, indem wir es fast wagerecht halten, dann den Rand desselben so weit abhitzen, als wir ihn über die Schale halten müssen. Hierauf heben wir den Deckel einer der drei Petrischalen so in die Höhe, daß er immer über der unteren Schale bleibt und als Staubschutz dient, und gießen, im Schutze des Deckels, die genügende Menge der Gelatine aus dem Gelatineröhrchen in die Petrischale aus, um danach sofort den Deckel wieder aufzulegen. Sind alle drei Petrischalen gegossen, so stellt man sie auf einen Porzellanteller, deckt sie mit einer Glasglocke zu und stellt sie bei Zimmertemperatur beiseite.

Schon nach 24 Stunden muß man die Schalen nachsehen und die Beobachtung derselben dann alle zwölf Stunden wiederholen. Es werden bald mehr oder weniger zahlreiche Kolonien auftreten, die zahlreichsten in der Verdünnung II. Wir warten so lange, bis die größte Kolonie einer Schale etwa 3 mm Durchmesser erreicht hat und untersuchen dann unsere Schalen genauer. Wir achten zuerst auf die Dichtigkeit der Lagerung der Kolonien. Wir dürfen die Kolonien zur Weiterzucht nur von denjenigen Schalen entnehmen, in welchen die Kolonien nicht zu dicht liegen, denn bei zu dichter Lagerung liegt die Gefahr zu nahe, daß auch Sporen zweier Spezies an der Bildung der Kolonie beteiligt gewesen sind. Am besten ist es, wenn die Schale, von welcher wir impfen, nicht mehr als 10 bis 15 Kolonien enthält. Wir legen nun eine der Schalen unter das Mikroskop und betrachten sie, ohne sie zu öffnen, indem wir den Boden der Schale nach unten oder auch nach oben kehren, bei richtiger Stellung der Blende. Wir fassen zuerst die Oberflächenkulturen ins Auge und vergleichen diese allein miteinander, um zu untersuchen, ob sich unter ihnen solche von wesentlich verschiedenem Aussehen vorfinden. Dabei achten wir vorzüglich auf folgende Momente.

1. Verflüssigt die Kolonie? 2. Wie ist die Gestalt der ganzen Kolonie und der Bau des Randes der Kolonie? 3. Wie ist die Farbe? 4. Wie verhält sich die feinere Struktur der Kolonie? Hierauf vergleichen wir auch die tiefer liegenden Kolonien unter sich. Oberflächen-

kolonien und Tiefenkolonien untereinander zu vergleichen ist zwecklos, da dieselbe Spezies verschieden wächst, wenn sie auf der Oberfläche oder in der Gelatine entsteht. Haben wir voneinander verschiedene Kolonien entdeckt, oder haben wir entschieden, daß alle Kolonien von einer Spezies herzurühren scheinen, so stellen wir die Schale, welche die am besten isoliert liegenden Kolonien enthält, aufrecht unter das Mikroskop, öffnen den Deckel und stellen eine Kolonie mit Objektiv A sorgfältigst ein. Hierauf nehmen wir mit der sterilen Platinnadel vorsichtig, ohne eine andere Kolonie zu berühren, eine Spur von der Oberfläche der Kolonie hinweg. Die Nadel streichen wir sofort auf der Fläche des Agars eines Agarröhrchens ab, um uns auf diese Weise eine Kultur der Spezies auf Agar anzulegen. Hierauf überzeugen wir uns durch nochmaliges Betrachten der Kolonie, ob wir auch wirklich die gewünschte Kolonie berührt haben. In gleicher Weise impfen wir von allen verschiedenen Arten der Kolonien ab und stellen die geimpften Agarröhrchen in den Brutschrank (28° C.). Die spätere Untersuchung der Kulturen wird dann zeigen, ob in jeder Kolonie wirklich nur eine Spezies vorhanden ist, was meist der Fall sein wird.

Die reingezüchteten Spezies stellen wir beiseite, um sie später zu bestimmen.

Allgemeine Bemerkungen über einige andere Methoden der Isolierung.

Will man aus zu pulverisierenden Objekten, z. B. Bodenproben, Einzelkolonien auf organisierten Nährsubstraten züchten, so kann man so verfahren, daß man das Objekt, z. B. den Boden, gut trocknet, pulverisiert und ganz fein auf die Kartoffelscheiben etc. aufstäubt.

Die Verdünnungen kann man unter Umständen, statt in Reagensgläsern, auf einem sterilen Objektträger herstellen. Man setzt zu dem Zwecke (am besten unter einem Schutztrichter) auf einen sterilen Objektträger vier Tropfen der Nährlösung I. Hierauf bringt man mit einer kleinen Platinöse eine Spur des Sporenmaterials von der Möhre in den ersten Tropfen, mischt sehr sorgfältig, glüht die Öse ab, um einen Ueberschuß des Sporenmaterials zu vernichten, der an der Öse kleben könnte, und nimmt nach dem Erkalten der Öse eine neue Spur der Verdünnung I zur Vermischung mit dem zweiten Tropfen. So fährt man fort, bis auch die Verdünnung IV hergestellt ist.

Die Isolierung der Sporen auf der Agarfläche kann man auch dadurch erreichen, daß man in die Verdünnung eine Platinnadel oder einen durch Liegen in 70prozentigem Alkohol sterilisierten, in sterilem Wasser nachgewaschenen, kleinen Pinsel eintaucht, den man am Rande eines sterilen Objektträgers etwas abstreicht, und mit diesen Instrumenten hintereinander an acht bis zehn Stellen der Agaroberfläche gesonderte, gerade Striche anbringt. Es erhält dann jeder folgende Strich etwas weniger Sporenmaterial als der vorhergehende, so daß im letzten Strich die Sporen am isoliertesten liegen. Die Agarflächen, welche man bei dieser Methode benutzt, müssen etwas älter und trockener sein, und es muß das Kondenswasser aus den Schalen ausgegossen sein. (Siehe dazu auch Kruse, Centralbl. f. Bakteriologie, Bd. XV, S. 419.)

Um stark aeroben, nicht sporenbildenden Formen, welche auf Agar besser wachsen als auf Gelatine, oder besser bei höherer Temperatur wachsen als bei gewöhnlicher Temperatur, die Möglichkeit zur Entwickelung zu geben, kann man auch in folgender Weise Kulturen

auf Agar herstellen. Man gießt einige Tage vor Beginn des Versuches in drei Agarschalen je den Inhalt eines geschmolzenen Agarröhrchens aus und stellt die Agarschalen schräg, so daß die Agarmasse in schräger Schicht erstarrt. Man stellt zur Ausführung der Impfung die Schalen bereit, ebenso die Flamme und die Platinöse und verfährt im allgemeinen, wie es bei den Gelatineplatten gelehrt wurde. Man stellt, wie dort, nur mit dem Unterschiede, daß man Reagensgläser mit je 5 ccm Nährlösung I benutzt, vier Verdünnungen von dem Materiale her. Von der zweiten, dritten und vierten Verdünnung gießt man hierauf je soviel auf die Oberfläche des Agars je einer Schale, daß die Oberfläche des Agars von einer äußerst dünnen Schicht der Lösung gerade bedeckt ist. Man schließt die Schale, verteilt die geringe Flüssigkeitsmenge durch Bewegen der Schale möglichst gleichmäßig auf der Agarfläche, läßt die Schale dann eine Stunde stehen und gießt hierauf die Flüssigkeit, welche sich an der Basis der Agarschicht ansammelte, völlig ab. Dann stellt man die Schale bei 28° (eventuell auch bei höherer oder bei gewöhnlicher Temperatur) beiseite. Die sich entwickelnden Kolonien werden behandelt, wie es bei den Gelatineplatten gelehrt wurde. (Siehe dazu auch Banti, Centralbl. f. Bakt., 1895, Bd. XVII, S. 556; Bd. XVIII, S. 203; Freudenreich, ebenda, 1894, Bd. XV, S. 643.)

Erwähnt muß auch die Verdünnungsmethode (siehe Hueppe, 1891, S. 306; Kloecker, 1900, S. 84; Hansen, Zeitschrift f. wiss. Mikrosk. 1884, S. 191) werden. Man bestimmt in der Lösung, welche das Bakteriengemisch enthält, die Zahl der Individuen, welche in 1 ccm desselben enthalten sind, mit Hilfe einer Zählkammer (Zählkammer von Thoma mit Deckgläschen von 0,18—0,20 mm, bezogen von Zeiß). Einen Teil der Lösung verdünnt man dann so mit Nährlösung oder Wasser, daß in 1 ccm derselben nur ein Individuum vorkommt. Man schüttelt längere Zeit stark, um das Material zu zerteilen, und impft mit je 7 Tropfen der fortgesetzt geschüttelten Flüssigkeit 25 bis 50 Kölbchen mit 10—20 ccm Nährlösung. Mindestens die Hälfte der Kölbchen muß steril bleiben, wenn die Verdünnung richtig war. In einem oder dem anderen Kölbchen wird dann wahrscheinlich eine Reinkultur entstehen; vielleicht finden sich in verschiedenen Kölbchen Reinkulturen verschiedener Spezies.

Bei Hefen sieht man, wenn die Kölbchen recht ruhig stehen, sich am Boden aus jedem Individuum eine Kolonie entwickeln.

Für Hefen verweise ich auch auf die zweite Reinzuchtmethode Hansen's (1883), Kloecker, 1900, S. 88) und die Tröpfchenmethode Lindner's (1893), Lindner, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 2. Aufl., Berlin 1898), sowie auf die Kombination der beiden Methoden in dem Verfahren Schönfeld's (Kloecker 1900, S, 92).

Kapitel XI.

Kultur in Flüssigkeit im Reagensglase, Sporen und Membranfärbungen derselben, Bewegung der Schwärmoidien, Ruhestäbchen, Sporenbildung, Schleim und Glykogen.

Uebung 12.

Ueber Bacillus asterosporus.

Litteratur.

Arthur Meyer, *Studien über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien, ausgeführt an Astasia asterospora A. M. und Bacillus tumescens Zopf; Flora, Erg.-Bd. 1897, 84. Bd., Heft 3.* ***Migula,*** *Weitere Untersuchungen über Astasia asterospora Meyer; Flora, 1898, 85. Bd., S. 141.* ***Arthur Meyer,*** *Ueber Geisseln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien; Flora 1899, 86. Bd., S. 428.* ***Gottheil,*** *Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien, C. f. B. 1901, II. Abt., VII. Bd. No. 12 u. f., S. 727.*

Wir haben früher Bacillus asterosporus auf Möhrenscheiben geimpft (Uebung 6 b). Wenn die Kultur ungefähr 14 Tage alt ist, so sind die Sporen dieser Kulturen so weit ausgereift, daß wir sie benutzen können.

Wir nehmen mit der Platinöse eine größere Menge des Sporenmaterials ab, bringen es in 1 ccm Nährlösung I, welche sich in einem sterilen Reagensglase befindet und erwärmen das Reagensglas zwei bis drei Minuten in einem vorher zum Sieden erhitzten Wasserbade, so daß alle Zellfäden und Oidien abgetötet werden, die Sporen allein am Leben bleiben. Nur wenn wir von einem solchen („abgekochten") Materiale ausgehen, welches nur Sporen enthält, ist es möglich, Kulturen zu erhalten, welche nach annähernd bestimmter Zeit Bestimmtes zeigen.

Impft man Reagensgläser, welche 5 ccm sterile Nährlösung enthalten, je mit ein paar Ösen der die Sporen enthaltenden Nährlösung, und stellt man sie in den Brutschrank, dessen Brutraum eine konstante Temperatur von 28° C. hält, so findet man, daß diese Kulturen ungefähr die folgende Entwickelung nehmen.

Man findet nach 14—18 Stunden Schwärmoidien,
nach 24 Stunden Ruhezustände,
nach 48 Stunden Sporangien,
nach 64 Stunden isolierte Sporen.

Richten wir uns hiernach, so können wir, wenn wir Kulturen zur zweckmäßigen Zeit in Gang setzen, die für die folgenden Beobachtungen nötigen Entwickelungszustände der Spezies stets rechtzeitig zur Hand haben. Wollen wir z. B. Schwärmer beobachten, so setzen wir abends fünf Uhr, sechs Uhr und sieben Uhr je eine Kultur mit Nährlösung I an und haben dann sicher gegen zehn Uhr morgens, am anderen Tage, schöne Schwärmer.

Wir impfen vier Gläser mit Nährlösung in der oben angegebenen Weise zur passenden Zeit, stellen sie bei 28° in den Brutschrank und beobachten die Entwickelungszustände der möglichst wenig geschüttelten Kulturen teils makroskopisch, teils, indem wir mit der Platinöse passendes Material herausnehmen, mikroskopisch, täglich zweimal, um einen allgemeinen Ueberblick über die Entwickelungsgeschichte der Spezies zu erlangen.

Wir finden also nach 14 bis 18 Stunden Schwärmer in lebhafter Bewegung, wenn wir eine Spur der Flüssigkeit, ohne Deckglas, mit

dem Objektiv *E* beobachten. Ist die Kultur 23 bis 24 Stunden alt, so ist sie meist stark getrübt, man sieht sehr kleine Häufchen in der Flüssigkeit schwimmen und bemerkt wohl schon eine schwache Gasentwickelung. Fischt man ein Häufchen heraus und beobachtet es unter dem Deckglase mit der Immersion, so findet man, daß es aus ruhenden Oidien besteht, die nicht in Sporenbildung begriffen sind und bemerkt wohl noch Schwärmer in der Flüssigkeit. Die Gasentwickelung nimmt nun mit der Zeit weiter zu, die Stäbchenhaufen vergrößern sich zu schleimigen Flocken, welche sich, durch Gasblasen getragen, auf der Oberfläche der Flüssigkeit ansammeln. Nach 50 Stunden ist die Gasentwickelung meist schon beendet, die Schleimflocken haben sich dann zu Boden gesenkt und in ihnen finden sich unter den ruhenden Stäbchen viele solcher, welche Sporen zu entwickeln beginnen. Nach 60 Stunden sind meist schon freie Sporen in der Kultur, vorzüglich am Boden des Reagensglases, aufzufinden. Nach etwa vier Tagen steht das Wachstum der Kultur völlig still.

Während der Zeit, welche über der Entwickelung der vier Kulturen verstreicht, beginnen wir schon damit, die verschiedenen Morphoden der Spezies genauer zu untersuchen, für deren Vorhandensein wir also durch rechtzeitiges Ansetzen neuer Kulturen sorgen. Soweit es möglich ist, entnehmen wir passendes Material auch unseren vier Kulturen.

Die Sporen, die Exine und Intine und deren Färbung.

Wir benutzen Sporen, welche wir von der alten Möhrenkultur oder von einer Dextroseagarkultur mittelst der sterilen Platinöse ent-

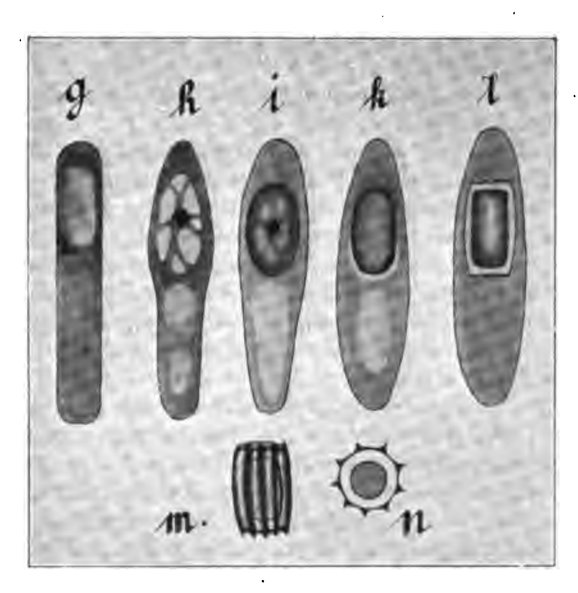


Fig. 23. Bacillus asterosporus. Sporenentwickelung im Sporangium von Bacillus asterosporus, g Anfangsstadium, l Endstadium, m und n freie Sporen des Spaltpilzes.

nehmen. Wir stellen mit der homog. Immers. $^1/_{12}$ und dem Kompensationsokulare 4*) ein und untersuchen dann mit dem Kompensations-

*) In allen Fällen ist mit Vorteil für die Immersion $^1/_{12}$ die Apochromat-Immersion zu verwenden, wenn dieselbe vorhanden ist.

okulare 12 genauer. Zuerst untersuchen wir in Wasser. Die Spore zeigt eine in Exine und Intine gegliederte Membran, welche das Stäbchen einschließt. Die Exine der Membran trägt Leisten, welche am besten zu erkennen sind, wenn man eine aufrechtstehende Spore betrachtet, so daß man den optischen Querschnitt der gestreckten Spore sieht (Fig. 23 *n*). In der Figur ist die Exine dunkel gehalten, die helle Partie um die innere, dunkle Kreisfläche ist die Intine, die Kreisfläche ist das Stäbchen. Liegt die Spore auf der Seite (Fig. 23 *m*), so ist die Struktur der Membran schwieriger zu erkennen. Wir setzen nun seitlich etwas Jodjodkaliumlösung (*sch*) an das Deckglas und beobachten die Einwirkung des zu den Sporen eindringenden Reagenses. Zuerst färbt sich die Exine durch das Jod, dann aber nimmt die ganze Spore das Jod auf.

Wir beobachten dann ferner das Verhalten der Spore gegen Fuchsinlösung (*v*). Wir setzen eine Öse voll des vorher mit etwas Wasser auf einem Objektträger verdünnten Sporenmaterials auf einen Objektträger, fügen eine Spur ($^1/_5$ Öse) der Fuchsinlösung hinzu, mischen gut mit der Platinöse und legen dann ein Deckglas auf. Nach zehn Minuten beobachten wir. Wir finden, daß zuerst die Exine, dann nach und nach auch die Intine gefärbt wird. Das Stäbchen erscheint nur bei zerquetschten Sporen rot gefärbt. Zerquetschung der Sporen findet sehr leicht statt, wenn man auf das Deckglas drückt. Man sehe sich zerquetschte Individuen an, die man erhält, wenn man mit einem Glasstabe einen Druck auf das Deckglas ausübt. Methylenblau (1 + 10) wenden wir in ganz gleicher Weise zur Färbung an wie die Fuchsinlösung. Wir finden, daß Exine und Intine zugleich gefärbt werden. Nach Gram färben sich anscheinend Exine und Intine nicht besser als mit Methylenblau.

Bei allen diesen Beobachtungen fällt uns vielleicht auch hie und da bei manchen Sporen auf, daß die Leisten der Exine mit kleinen Zähnchen versehen sind, die im Bilde nicht dargestellt sind.

Die Schwärmoidien. Wir untersuchen eine ungefähr 14 bis 16 Stunden alte Reagenglaskultur in Nährlösung I, die wir also ungefähr abends zwischen 5 und 7 ansetzen und morgens zwischen 9 und 11 untersuchen. Wir bringen ein Tröpfchen der Flüssigkeit auf den Objektträger, legen ein Haar dazu, decken ein Deckglas auf und beobachten mit Objektiv E und einem schwachen Okular, zuletzt auch mit Immers. $^1/_{12}$, um alle Formen der Oidien und alle Formen ihrer Bewegung genau zu studieren.

Jeder der kleinen Schwärmer, welcher in unserer Kultur nach etwa fünf bis acht Stunden aus der Spore ausschlüpfte und sofort Geißeln erhielt, hat sich in späterer Zeit fortgesetzt in neue Schwärmoidien geteilt, und wir finden so jetzt in der Kultur zahlreiche Schwärmer, die schon bei ihrer Entstehung ungleich lang angelegt werden, dann auch ungleich heranwachsen, ehe sie sich teilen. Manche Schwärmer zeigen schwache Einschnürungen als Zeichen der beginnenden Teilung; bei solchen, die kurz vor dem Zerfalle in zwei neue Schwärmoidien stehen, ist die Einschnürung sehr tief, so daß man solche Formen als Doppelschwärmer bezeichnen kann. Alle Schwärmer sind in lebhafter Bewegung. Meist ist dieselbe im allgemeinen eine geradlinige Vorwärtsbewegung. Die meisten Stäbchen wirbeln, ohne sich um ihre Längsachse zu drehen, während dieser Vorwärtsbewegung nach rechts und links hin und her. Der Drehpunkt des Schwärmers liegt dabei meist dem Vorderende

stark genähert. Manchmal drehen sich die Stäbchen aber auch um ihre Längsachse, was man bei gekrümmten Stäbchen leicht beobachten kann, deren Vorder- und Hinterende dabei einen Kreis beschreiben. Stäbchen mit schwacher Einschnürung in der Mitte wackeln oft mit gleichem Ausschlage beider Enden, und es sieht dabei manchmal so aus, als schlängelten sie sich, weil der Schwärmer in der Einschnürung charnierartig beweglich ist; bei tieferer Einschnürung findet ein starkes Hin- und Herschleudern der beiden Hälften statt. Die Schwärmoidien ändern oft, ohne daß sie sich drehen, ihre Bewegungsrichtung.

Wir setzen zum Präparate seitlich etwas Methylenblaulösung (1 + 10); es färben sich dann die Schwärmer nach und nach und bleiben dabei anfangs völlig in Bewegung. Zuerst färbt sich die Membran der Schwärmer, soweit sie nicht außen in Gallerte übergegangen ist, dann nimmt der Protoplast den Farbstoff auf. Abgestorbene Stäbchen färben sich sofort in allen ihren Teilen.

Man kann die Schwärmer sofort zum Absterben bringen, wenn man das Präparat, ohne Deckglas, einige Augenblicke über den Hals einer Flasche mit Osmiumsäurelösung (einprozentige Osmiumsäure) hält, ebenso tötet Formaldehyd sehr schnell. Wir fügen zu einem Präparate ein wenig Formol mit der Platinöse hinzu und setzen dann, nach Auflegen des Deckglases, seitlich etwas Methylenblaulösung hinzu. In den toten, gefärbten Stäbchen erkennen wir leicht ein bis vier hellere Stellen, welche ein bis vier einzelne Vakuolen oder auch Vakuolenkomplexe sind, welche durch kräftige Plasmabrücken getrennt sind, in denen später die Quermembranen entstehen; hie und da sieht man in einer solchen Plasmabrücke schon die farblose junge Membran liegen.

Die Ruhestäbchen vor der Sporenbildung. Wenn man aus 16 Stunden alten Agarkulturen eine Kleinigkeit des Bakterienmateriales herausnimmt und, mit etwas Nährlösung verdünnt, auf dem Objektträger beobachtet, so kann man oft sehen, daß sich die Schwärmer in dem Tropfen nach gewissen Zentren hinbewegen und dort zur Ruhe kommen, indem sie zugleich Schleim abscheiden. Mittelst des Schleimes verkleben sie zu kleinen, runden Kolonien, welche durch Wachstum und Teilung der zur Ruhe gekommenen Stäbchen, sowie durch Hinzuschwärmen neuer Oidien sich fortgesetzt vergrößern. Es interessieren uns hier nun die in Ruhe gekommenen, sich im Ruhezustande noch weiter teilenden Stäbchen, deren festeren, inneren Membranpartien stark verquollene Schleimschichten aufsitzen. Zu ihrer Untersuchung benutzen wir 40 Stunden alte Kulturen in Nährlösung I (setzen wir abends 6 Uhr an, so können wir nach zwei Tagen um 10 Uhr morgens untersuchen), in welcher Schleimflocken aus Ruhestäbchen schwimmen, in denen hie und da schon die Sporenbildung beginnt. Wir fischen mit der sterilen Platinöse ein kleines Schleimflöckchen heraus, legen es unter ein Deckglas und untersuchen es genau mit der Immersion. Wir finden die meisten Stäbchen in Ruhe, nur wenige sehr kurze bis sehr lange Schwärmer bewegen sich zwischen den Ruhestäbchen hin und her. Die Ruhestäbchen sind meist ein- bis zweilang (das heißt ein- bis zweimal so lang wie ein normales Sporangium), können jedoch auch bis über 15-lang werden.

Die Sporenbildung und der Glykogennachweis. Wir bringen ein Schleimflöckchen aus einer ungefähr 48 Stunden alten Kultur in Nährlösung I unter das Deckglas und untersuchen mit der

Immersion, bei sorgfältig regulierter, nicht zu weit geöffneter Blende. In zahlreichen einzelligen, meist spindelförmig angeschwollenen Stäbchen, den normalen Sporangien (Fig. 23 *i*, *k*, *l*), sehen wir, meist dem einen Ende des Sporangiums genähert, eine Spore liegen. Nicht selten sind die Sporangien trommelschlägelförmig und führen auch, wenn sie zweilang sind, hie und da zwei Sporen. Die Sporangien sind mit einer Schleimhülle umgeben.

Wenn wir sehr viele Sporangien durchmustern, so werden wir alle Stadien der Entwickelung der Sporangien und ihrer Sporen auffinden können. Wir wollen in einem oder in mehreren Präparaten nach den im folgenden beschriebenen Entwickelungsstadien der Sporangien suchen und sie alle nach der Natur zeichnen. Wir wenden dabei die $^1/_{12}$ Immersion, eventuell auch die Apochromatimmersion an.

Die erste Erscheinung, welche den Beginn der Sporenbildung verrät, ist eine Anschwellung des Ruhestäbchens, wobei zugleich eine Zuspitzung des jungen Sporangiums eintritt. Zugleich sieht man in einem solchen jungen Sporangium an dem einen Ende eine mehr oder weniger deutliche, bei tiefer Einstellung etwas heller als das umgebende Zytoplasma erscheinende Vakuole auftreten (Fig. 23 *g*). Nicht selten gelingt es, in der Vakuole einen Zellkern, ohne Färbungsmittel, direkt als ein stärker lichtbrechendes, bei hoher Einstellung also helles, bei tiefer Einstellung also relativ dunkles Körperchen (Fig. 23 *h*) zu erkennen. Der Inhalt der Vakuole wird hierauf dichter, so daß die Stelle der Vakuole jetzt stärker lichtbrechend erscheint, als das sie umgebende Zytoplasma (Fig. 23 *i*). Die Sporenanlage, welche noch vom Zytoplasma umgeben ist, wird immer stärker lichtbrechend, und es bildet sich zugleich meist eine helle Zone um die Sporenanlage (Fig. 23 *k*). Die Spore ist jetzt noch nackt und umgibt sich weiter sehr langsam mit der Sporenmembran (Fig. 23 *l*), auf der schliesslich die Leisten ausgebildet werden. Zuletzt löst sich die Membran des Sporangiums auf, dann auch der Rest des Zytoplasmas, welcher unter Umständen der Spore noch einige Zeit nach der Lösung der Membran anhaften kann.

Wir suchen also nun in dem Materiale unserer Kultur nach Sporangien mit fast oder ganz reifen Sporen, welche der Fig. 23 *l* entsprechen, dann nach solchen, die den Zuständen *k*, *i*, *h* und *g* entsprechen. In denjenigen Sporangien, in welchen der Sporeninhalt fast genau so lichtbrechend ist, wie das umgebende Zytoplasma, können wir dabei, bei sehr genauem Zusehen, vorzüglich bei hoher Einstellung den relativ stark lichtbrechenden Zellkern als kleines Pünktchen erkennen.

Wir bringen dann etwas des Materials, ein kleines Flöckchen desselben, unter ein Deckglas, setzen seitlich ein wenig Jodjodkaliumlösung k zu und beobachten sofort die an der Grenze zwischen der eindringenden Jodlösung und der ungefärbten Flüssigkeit liegenden Sporangien. Mit dieser „k-Jodmethode" erkennen wir bei s e h r g e n a u e m Z u s e h e n meist den Zellkern in dem der Fig. *h* entsprechenden Stadium relativ dunkelbraun gefärbt und nicht selten viel heller braune Plasmafäden, an welchen der Kern aufgehängt ist, daneben oft in dem Zytoplasma noch einen zweiten Kern. In Stadien, welche der Fig. *k* entsprechen, erscheint die Spore braun wie das Zytoplasma gefärbt und von einer hellen Zone umgeben, und meist erkennt man auch die in der Figur *k* angedeutete helle Vakuole.

Dann gehen wir dazu über, in den jugendlichen Sporangien das Glykogen nachzuweisen, welches hier als Reservestoff meist gespeichert ist. Zu dem Zwecke bringen wir eine Öse voll des Materials auf den Objektträger und mischen es mit einer Spur Jodjodkaliumlösung sch.

Der Jodzusatz muß so bemessen werden, daß die Flüssigkeit farblos bleibt, das Zytoplasma ganz schwach bräunlich gefärbt erscheint. Beobachten wir so behandelte junge Sporangien mit der Immersion bei ziemlich weit geöffneter Blende, so sehen wir tief rotbraun gefärbte Flecke und Binden in den Sporangien, welche aus dem sich mit Jod rotbraun färbenden Kohlehydrate bestehen. Besonders gut gelingt die Reaktion, wenn man Material verwendet, welches von einer 40 Stunden alten, mit der Sporenbildung beginnenden Agarkultur stammt. Eine solche stellen wir uns her, wenn die Reaktion mit dem in Nährlösung gewachsenen Materiale nicht gelingen sollte, um sie zum Nachweise des Glykogens in den jungen Sporangien zu verwenden.

Kapitel XII.

Allgemeines über das Glykogen.

Litteratur.

Beijerinck, *Ueber die Butylalkoholgärung und das Butylferment, Verhandlungen der Koninklijken Akademie van Wetenschappen te Amsterdam 1893, II. Sect. Deel. I No. 10.* ***Arthur Meyer,*** *Ueber Geisseln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien, Flora 1899, Bd. LXVI, Heft 15.* ***Gottheil,*** *Centralbl. f. Bakt. 1901, II. Abt., Bd. VII, S. 430.* ***Grimme,*** *Dissertation, Marburg 1902.*

A. Allgemeines.

Wichtige, zur Gruppe der Kohlehydrate gehörende Reservestoffe der Bakterien, die vorzüglich vor der Sporenbildung reichlich in den Zellen der Bakterien auftreten, sind das Glykogen (Bakterienglykogen) und die gewöhnlich „Granulose“ genannte Substanz, welche wir, um anzudeuten, daß sie wahrscheinlich nicht mit der Stärkesubstanz identisch ist, „Iogen“ nennen wollen.

Beide Stoffe sind farblos und liegen im Zytoplasma in Form relativ stark lichtbrechender, zähflüssiger Massen. Beide Stoffe lösen sich, wenn man die Bakterien drei Minuten im Reagensglase mit 5 ccm Wasser und 2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure kocht; sie lösen sich in Malzauszug in 24 Stunden bei 28° C.

Mit sehr verdünntem Jodjodkalium färbt sich das Glykogen rein braun, das Iogen rein blau. Sind beide Kohlehydrate, die vielleicht in demselben Verhältnis zueinander stehen wie die Amylose zum Amylodextrin, miteinander in der Zelle gemischt, so färbt sich das Gemisch bei Zusatz von äußerst wenig Jod blau, bei Zusatz von viel Jod braun.

In angetrockneten mit konzentrierten Fuchsinlösungen, Methylenblaulösungen oder nach Gram gefärbten Bakterien tritt das Glykogen als heller als das Zytoplasma gefärbte Stelle hervor (Grimme 1902, S. 55).

„Glykogen“ ist auch bei den Pilzen gefunden worden, ebenso bei den Zyanophyzeen, doch ist es fraglich, ob alle diese Körper völlig identisch sind.

Die verschiedenen Bakterienspezies verhalten sich bezüglich des Vorkommens des Glykogens verschieden. Bestimmte Spezies erzeugen leicht Glykogen, andere sind stets frei davon. Andere Spezies erzeugen neben Glykogen Iogen. Von den von uns genauer untersuchten Spezies (GOTTHEIL, S. 460) erzeugen unter gewöhnlichen Umständen kein Glykogen, dafür Fett: Bac. Ellenbachensis, graveolens, mycoides, Petasites, ruminatus, tumescens, erzeugen Glykogen: Bac. Carotarum, simplex, cohaerens, asterosporus, subtilis. Es erzeugen Iogen neben Glykogen: manche sog. Amylobacter-Arten.

Das Glykogen läßt sich viel reichlicher und leichter in mit abgekochten Sporen angelegten Kulturen von Bacillus cohaerens (von KRAL zu beziehen), die auf Agar 60 Stunden lang bei 28° wuchsen, nachweisen. Wir studieren eventuell die Reaktionen des Glykogens an diesem Objekte. Das Iogen können wir an einer Amylobacter-Art studieren, welche wir nach der folgenden Anleitung leicht fangen können.

B. Methode zur Züchtung von Amylobacterarten.

Man züchtet sich Amylobacterarten leicht nach der Methode, die BEIJERINCK (1893, S. 10) angegeben hat. Man bringt in einem hohen und schmalen Becherglase 100 ccm Wasser zum Kochen, bis die gelöste Luft entfernt ist, dann fügt man grob gemahlenes Reismehl (aus Futtermittelhandlungen zu beziehen) oder gemahlene Hafergrütze, oder grob gemahlene, nackte Gerste mit einem Löffel nach und nach hinzu, bis die Masse dickbreiig ist und der Löffel gerade darin steht. Hierauf rührt man eine Messerspitze voll Mehl tüchtig unter, so daß alle Oidien noch getötet werden können, die Sporen zurückbleiben. Man bedeckt das Gläschen mit einer Glasplatte und stellt es bei 35—37° beiseite. Nach 12—36 Stunden wird Gärung eingetreten sein, und dann sucht man nach jungen, spindelförmig angeschwollenen Sporangien, in denen die Iogenmassen nachzuweisen sind.

Kapitel XIII.

Allgemeines über das Volutin.

Litteratur.

Grimme, *Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung, Dissertation, Marburg 1902.* — ***David Ellis,*** *Beiträge zur Kenntnis der Coccaceen und Spirillaceen, Dissertation, Marburg 1903; Centralbl. f. Bakteriol. 1902/1903, 1. Abt., Bd. XIII.*

Allgemeines.

Ein eigenartiger Reservestoff, welcher sowohl neben Fett als auch neben Glykogen oder auch allein in den Zellen der Bakterien vorkommen kann, wohl auch bei den Pilzen und Zyanophyzeen verbreitet sein wird, ist das Volutin. Den Namen habe ich nach dem Spirillum volutans KUTSCHER gebildet, in dessen Zellen Kugeln dieser Substanz vorkommen, die ich Volutanskugeln nannte. Als Volutin bezeichne ich also alle die Substanzen, welche in ihrem mikrochemischen Verhalten mit der Substanz der Kugeln des Spirillum volutans KUTSCHER (Sp. giganteum MIGULA) übereinstimmen. Manche der früher als BABES-ERNST'sche Körperchen bezeichneten Gebilde waren Volutanskugeln.

Das Volutin ist farblos, fast so stark lichtbrechend wie die Fetttropfen der Bakterien, zähflüssig oder breiig. Von dem Fette unterscheidet es sich dadurch leicht, daß es sich mit Sudan nicht rötet, vom Glykogen dadurch, daß es sich mit Jodlösung nicht dunkler färbt als das Zytoplasma.

Die wichtigsten Reaktionen des Volutins sind die folgenden:

Färbungen. Methylenblau 1 + 10: Die Volutinmassen quellen, färben sich intensiv und runden sich ab; Methylenblau mit einprozentiger Schwefelsäure: Das Zytoplasma entfärbt sich, die Volutanskugeln färben sich intensiv blau; Karbolfuchsin: Das Volutin färbt sich kaum mehr rot als das Zytoplasma; Karbolfuchsin, darauf einprozentige Schwefelsäure: Die Volutanskugeln treten tiefrot hervor, das Zytoplasma entfärbt sich. Jodjodkalium *sch* färbt das Volutin hellgelb, wie es Zytoplasma färbt; Jodjodkalium *k*: Die Volutanskugeln erscheinen bei hoher Einstellung dunkel-, bei tiefer hellgelb und scharf begrenzt; Methylviolett, Safranin, Bismarckbraun färben die Kugeln. Eosin, Boraxkarmin färben sie nicht; Hämatoxylin DELAFIELT färbt sehr langsam. Nach GRAM färben sich die Kugeln nicht.

Lösungsmittel. Wasser löst bei 28° in zwei Tagen, bei 80 bis 100° in einigen Minuten; fünfprozentige Schwefelsäure löst in zehn Minuten, gesättigte Natriumkarbonatlösung in einigen Minuten; Chloralhydrat (5 + 2) löst in fünf Minuten nicht; zehnprozentige Kochsalzlösung löst in 15 Minuten nicht; Alkohol, Aether, Chloroform lösen nicht.

Eau de Javelle. Dieses Reagens zerstört in fünf Minuten die Volutanskugel nicht.

Trypsin und Pepsin. Wirken nicht anders als Wasser.

Fixierungsmittel. Formaldehydhärtung vermindert die Löslichkeit in Natriumkarbonat, Osmiumsäurefixierung die in Kalilauge, Alkoholfixierung die in Wasser von 80°.

Die leichte Färbbarkeit des Volutins durch die Farbstoffe, welche auch Zytoplasma färben, das Verhalten gegen die Fixierungsmittel und gegen Alkalien lassen es möglich erscheinen, daß das Volutin ein eiweißartiger Körper im weitesten Sinne ist. Volutin ist sehr verbreitet bei den Bakterien. Es wurde in vielen Bazillus-Arten, in Pseudomonasarten, im Diphtheriebazillus gefunden, dagegen nicht gefunden bei Sarcina ureae (ELLIS 1892, S. 11), Streptococcus tyrogenus (ELLIS 1892, S. 24). In Fig. 44 ist ein verzweigtes Exemplar von Spirillum volutans gezeichnet, in welchem zahlreiche Volutinkugeln liegen. Das Präparat stammt von einer 48 Stunden alten Agarkultur, welche bei 28° wuchs; es wurde zuerst mit Gelblösung behandelt, zur Färbung des Fettes, dann mit Methylenblau 1 + 10.

Uebung 13.

Ueber die Volutanskugeln von Bacillus alvei.

Für die Reaktionen auf die Volutanskugeln verwenden wir am besten Material, welches aus zwei Minuten abgekochten Sporen von Bacillus alvei auf Dextroseagar bei 28° C. in 18 bis 20 Stunden erwachsen ist. Es müssen zahlreiche junge Sporangien in dem Materiale vorhanden sein. Der Bacillus alvei kann von KRAL bezogen werden. Meine Kultur habe ich seiner Zeit von Herrn Dr. KROMPECHER erhalten.

Volutanskugeln kommen ferner vor in Pseudomonas-Spezies, bei Spirillum volutans KUTSCHER, bei Bacillus asterosporus.

Methylenblau 1 + 10 und siebenprozentige Schwefelsäure und lebendes Material.

Man verrührt eine Öse voll von der Kultur mit einem Tropfen Methylenblau 1 + 10 und läßt das Gemisch ungefähr fünf Minuten lang stehen. Davon bringt man eine Öse voll unter das Deckglas und beobachtet. Die Oidien und jungen Sporangien färben sich durchgehend blaß, die jungen Sporen in den Sporangien etwas dunkler. In den Oidien und vorzüglich in dem schlanken Teile der Sporangien, aber auch in der Peripherie des angeschwollenen Teiles, also immer im Zytoplasma, sieht man dunkelblaue Volutanskugeln liegen (Taf. I, Fig. 1). Wir fügen etwas einprozentige Schwefelsäure hinzu. Die Volutanskugeln treten schärfer hervor.

Verfahren, um an angetrocknetem, unfixiertem Materiale einzelne bestimmte Stäbchen mit verschiedenen Reagentien zu behandeln.

Wir wollen jetzt ein Verfahren einüben, welches uns gestattet, eine einzelne Volutanskugel mit verschiedenen Reagentien nacheinander zu untersuchen. Wir stellen uns zuerst „angetrocknetes Deckglasmaterial" her. Eine Öse des Bakterienmaterials wird mit einem kleinen Tropfen Wasser auf einem Objektträger gut gemischt. Sechs Stück sehr sauber gereinigte Deckgläser werden mittelst der in diese Mischung getauchten Platinöse mit der Mischung möglichst dünn bestrichen, und nach dem Trocknen wird die Ecke der bestrichenen Seite mit dem Fettstifte etwas gefärbt, so daß man die Materialseite stets leicht erkennen kann. Das Material bewahren wir in einer Petrischale auf.

Reaktion mit Methylenblau, Natriumkarbonat, Methylenblau.

Auf die Materialseite eines so beschickten Deckgläschens träufeln wir mit einem Glasstabe oder mit einer Pipette einige Tropfen Methylenblau 1 + 10 auf und lassen dasselbe nicht länger als 2 Minuten einwirken. Wir spülen mit Wasser gut ab, lassen das Wasser vom Deckglase auf etwas Fließpapier ablaufen, reinigen die eine Seite und legen das Deckglas mit der Materialseite auf ein Tröpfchen Wasser, in dem ein Haar liegt, auf den Objektträger. Wir versehen dann mittelst des Dochtes eines Wachskerzchens das Deckglas oben und unten mit einem Wachsrande, so daß es festliegt und wir die Reagentien von rechts nach links unter dem Deckglase leicht durchziehen können.

Wir beobachten nun das in Wasser liegende, mit Methylenblau gefärbte Objekt (Taf. I, Fig. 2). Das Zytoplasma der Stäbchen erscheint blau gefärbt, und in den Oidien und den Sporangien sieht man dunkelblau gefärbte Körner liegen. Sie liegen in den Sporangien meist in dem dünneren Teile der an der Sporen bildenden Stelle angeschwollenen Sporangien, selten in der Zytoplasma führenden Peripherie der angeschwollenen Partie.

Wir setzen jetzt seitlich fünfprozentige Natriumkarbonatlösung hinzu und saugen sie mittelst Fließpapier hindurch. Wir sehen sofort die Farbe der Kugeln erblassen, dann an Stelle der Kugeln eine helle Stelle erscheinen. Trifft das zuströmende Natriumkarbonat die Stäbchen gut, so entfärben sie sich nach und nach, und es entsteht eine schwach

lichtbrechende, bei hoher Einstellung dunkel erscheinende Stelle am Orte der Volutanskugel (Taf. I, Fig. 4).

Läßt man nach der Entfärbung noch 5 Minuten einwirken, wäscht man dann mit Wasser aus, so verschwinden die hellen Stellen, wahrscheinlich infolge der Veränderungen im Zytoplasma oft. Setzt man nun wieder etwas Methylenblau zu, und wäscht man mit Wasser nach, dem man eine Spur einprozentige Schwefelsäure zugesetzt hat, so erscheinen die Stellen wieder dunkler gefärbt als das Zytoplasma. Das geschieht selbst nach halbstündiger Einwirkung, doch ist die Färbung dann entschieden schwächer.

Das Volutin färbt sich also mit reinem Methylenblau leichter als das Zytoplasma. An Sodalösung gibt es den Farbstoff leichter ab als das Zytoplasma und löst sich, tritt aber anscheinend höchst langsam durch die Zellwand aus oder quillt nur mehr als das Zytoplasma oder wird weniger lichtbrechend als dieses.

Methylenblau 1 + 10 in einproz. Schwefelsäure und angetrocknetes Material.

Wir färben angetrocknetes Material 5 Minuten mit dem Methylenblau, legen dann das Präparat fest und fügen einprozentige Schwefelsäure hinzu. Die Volutanskugeln treten scharf hervor.

Methylenblau, Jodjodkalium, Natriumkarbonat.

Wir färben ein Präparat, wie vorher, mit Methylenblau (Taf. I, Fig. 2) und untersuchen es in Wasser liegend, dann setzen wir seitlich Jodjodkalium sch. hinzu. Das Zytoplasma färbt sich sofort gelb bis braun, die Volutanskugeln nehmen eine fast schwarze Farbe an (Fig. 3). Wir ziehen nun das Jodjodkalium ab und setzen seitlich fünfprozentige Natriumkarbonatlösung hinzu. Das Zytoplasma färbt sich sofort blau, verblaßt dann etwas, um sich schließlich zu entfärben, während die Volutanskugeln in eine schwächer lichtbrechende Vakuole verwandelt werden (Taf. I, Fig. 4). Gegen Methylenblau verhalten sich die Individuen nach dem Auswaschen wie bei der vorigen Reaktion.

Karbolfuchsin, einprozentige und fünfprozentige Schwefelsäure.

Wir bedecken die Materialseite eines Deckglases mit einem Tropfen Karbolfuchsin und lassen diesen 5 Minuten darauf stehen. Hierauf spülen wir mit destilliertem Wasser gut ab, legen das Präparat wie vorher auf den Objektträger und beobachten. Wir finden die Individuen ziemlich tief rot gefärbt und erkennen die Volutanskugeln kaum. Wir setzen jetzt seitlich einprozentige Schwefelsäure hinzu und saugen sie durch. Die Bakterien entfärben sich, und es treten die Volutanskugeln als dunkle Punkte scharf hervor. Wir setzen fünfprozentige Schwefelsäure hinzu und sehen, wie sich die Volutanskugeln entfärben, und wie an ihrer Stelle eine Vakuole entsteht.

Wir wollen weiter die Löslichkeit der Volutanskugeln in Wasser und Schwefelsäure prüfen.

Siedendes Wasser, Karbolfuchsin, einproz. Schwefelsäure.

Wir erhitzen in einem Becherglase Wasser zum Sieden, klemmen ein Deckgläschen mit der Ecke in eine Cornetpincette und tauchen das Deckgläschen 5 Minuten in das siedende Wasser, um die Volutanskugeln

zu lösen. Hierauf färben wir 5 Minuten mit Karbolfuchsin, waschen mit Wasser ab und legen das Präparat dann in ein Tröpfchen einprozentiger Schwefelsäure auf den Objektträger. Wir sehen jetzt keine Volutanskugeln mehr in dem Objekte.

Fünfprozentige Schwefelsäure, Karbolfuchsin und einprozentige Schwefelsäure.

Wir hängen ein beschicktes Deckglas 10 Minuten lang in fünfprozentige Schwefelsäure hinein, indem wir es mit der Cornetpincette halten. Danach spülen wir gut mit Wasser ab und färben mit Karbolfuchsin. Wir spülen mit Wasser, legen auf den Objektträger in ein Tröpfchen einprozentige Schwefelsäure und beobachten. Es sind jetzt die Volutanskugeln gelöst.

Kapitel XIV.

Uebung 14. Ueber Bacillus tumescens, die Sporenkeimung und den Fettnachweis.

Litteratur.

Arthur Meyer, *Studien über die Morphologie und Entwickelungsgeschichte der Bakterien, ausgeführt an Astasia asterospora A. M. und Bacillus tumescens Zopf; Flora, Ergänzungsband zum Jahrg. 1897, Bd. LXXXIV, S. 185.* — ***Arthur Meyer,*** *Ueber Geisseln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien; Flora, 1899, Bd. LXYXVIII, S. 428.* — *Dr.* ***O. Gottheil,*** *Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien; Botanisches Centralblatt 1891, II. Abt.* — ***Alfred Koch,*** *Ueber Morphologie und Entwickelungsgeschichte einiger endosporen Bakterienformen; Bot. Zeitung 1885, S. 313.* — ***Oswald Schreiber,*** *Ueber die physiologischen Bedingungen der endogenen Sporenbildung bei Bacillus anthracis, subtilis und tumescens; Centralbl. f. Bakteriol. 1896, I. Abt., No. 10/11, S. 359.* — ***Zopf,*** *Spaltpilze, 3. Aufl., S. 82,*

A. Die Sporen.

Wir untersuchen etwas des ausgereiften Sporenmaterials einer alten Kultur, am besten von einer Möhrenkultur oder von einer gesunden, älteren Agarkultur in Wasser. Die Sporen sind von recht wechselnder Größe und Form, 1,7—2 μ dick, 2,5—3 μ lang. Ihre Membran besitzt eine wechselnde Dicke. Wir beachten die verschiedenen Formen. Gut ausgebildete Sporen sind ungefähr ellipsoidisch, im Querschnitte kaum bemerkbar sechseckig, also fast kreisrund, etwas seitlich von ihren Polen mit je einem Spitzchen versehen (Taf. I, Fig. 8 und 9), dessen Größe sehr wechselt.

Wir setzen zu den im Wasser liegenden Sporen eine Öse voll Safraninlösung und mischen gut, ehe wir das Deckglas wieder auflegen. Wir sehen jetzt die Exine sehr schön rot gefärbt (Fig. 8 bis 10). Wir zeichnen die verschiedensten Sporenformen und Sporengrößen sehr genau, um ein Bild von der Variation der Sporenform zu erlangen. Wir führen die Zeichnung, wie gewöhnlich, mit Objektiv $^1/_{12}$ und Kompens.-Okular 12, unter Benutzung des Zeichenklotzes, aus.

B. Die Agarstrichkultur.

Beobachtung der Sporenkeimung. Wir nehmen eine Anzahl von Ösen guten, ausgereiften Sporenmaterials von der Möhrenkultur

oder einer alten Agarkultur, bringen sie in fünf Tropfen steriles Wasser, welches sich in einem kleinen Reagensgläschen befindet, wie wir es zum Abkochen der Sporen benutzen und erhitzen das Reagensröhrchen eine Minuten im siedenden Wasserbade. Von diesem Sporenmateriale tragen wir nun möglichst viel auf die schräge Oberfläche eines Agarröhrchens auf und stellen letzteres in den Brutschrank bei 28°. Nach ungefähr fünf Stunden beginnt die Keimung, und wir untersuchen von dieser Zeit an öfter etwas mit der Öse hinweggenommenes Sporenmaterial zuerst in etwas Kondenswasser des Agars. Wir erkennen, daß die Sporen vor der Keimung kaum mehr anschwellen als zur Größe, welche sie bei ihrer Fertigstellung im Sporangium besaßen, dann im Äquator aufreißen und das Keimstäbchen seitlich austreten lassen (äquatoriale Keimung). Die Keimstäbchen sind bei ihrem Austritte nicht viel länger als die Sporen (Kurzstäbchen), werden aber dann bis zum Eintritte der ersten Teilung 2- bis 3-lang, d. h. zwei- bis dreimal länger als ein normales Sporangium des Pilzes.

Wir beobachten verschiedene Keimungsstadien und Wachstumsstadien der Keimstäbchen nebeneinander, sehen Stadien, in welchen das Keimstäbchen sich in einen zwei- oder mehrstäbigen Zellfaden verwandelt hat und am Ende noch die Sporenmembran trägt und können wohl auch bald Schwärmoidien auffinden. Die Keimstäbchen entwickeln nämlich bald Geißeln und beginnen auch, nach kurzer Ruhe, meist bald zu schwärmen. In Fig. 14 ist ein nach LÖFFLER's Methode der Geisselfärbung gefärbtes Schwärmoidium dargestellt. Wir beachten, daß die Keimstäbchen und die jungen Schwärmer und Zellfäden meist vollständig homogen erscheinen, da anfangs kein Fett in ihnen gebildet wird. Wir färben nun zur Zeit, wenn die Sporenkeimung im regen Gange ist, und schon einige kurze, fettfreie Zellfäden gebildet sind, also ungefähr nach 6 Stunden, eine Öse des Materials nach der Formolfuchsinmethode, um die Kerne nachzuweisen. Wir rühren eine kleine Öse voll des Materials in einen Tropfen Formol auf dem Objektträger ein und lassen 5 Minuten einwirken. Hierauf setzen wir einen kleinen Tropfen frisch bereiteter Fuchsinlösung (die Menge der zugesetzten Fuchsinlösung ist auch von Bedeutung für das Gelingen der Färbung) hinzu und rühren mit dem Platindrahte gut und öfter um. Nach 10 Minuten untersuchen wir eine Öse des Materials mit dem Immersionssysteme. Treten die Kerne noch nicht hervor, so untersuchen wir nach je 5 Minuten wieder, bis die Kerne so deutlich zu erkennen sind, wie in den Figuren 13 und 15. Wir zeichnen die keimenden Sporen und die Keimstäbchen und Zellfäden in verschiedenen Stadien der Entwickelung.

Fortgesetzte Beobachtung einer normalen Agarstrichkultur auf Dextroseagar, welche bei 28° gehalten wird. Es kommt uns hier in erster Linie darauf an, genau die Art und Weise der Septierung, also der Zellbildung in den Zellfäden, der Stäbchenbildung in den Zellfäden und des Zerfalls der Fäden in Oidien zu verfolgen. Auch wollen wir der Bildung und den Eigenschaften des Fettes, welches bei Bacillus tumescens vorkommt, unsere Aufmerksamkeit schenken. Ferner muß auf die Form der Sporangien und die Form des Verbandes der Sporangien besondere Rücksicht genommen werden. Wir beobachten aber auch zugleich das äußere Aussehen der Kultur und die Veränderung des letzteren während der Entwickelung der Kultur. Es mag deshalb nachher zuerst die Beschreibung der Ent-

wickelung des äußeren Aussehens der Kultur im Zusammenhange kurz gegeben sein.

Wir setzen also eine Strichkultur (eventuell auch, wenn es uns zweckmäßig erscheint, mehrere Kulturen zugleich oder nacheinander) in der früher geübten Weise an. Wir benutzen ein nicht zu altes, mit genügendem Kondenswasser versehenes Agarröhrchen, nehmen mit der Platinöse eine Spur des abgekochten Sporenmaterials heraus, indem wir sie nur in dieses eintauchen und streichen es mit einem Striche von unten nach oben auf der schrägen Agarfläche ab. Das Agarröhrchen wird in den Brutschrank, bei 28°, gestellt.

Beobachten wir die Agarstrichkultur direkt während ihrer Entwickelung, so erkennen wir folgende Kulturmerkmale an der Kolonie. Nach 14 Stunden dünne, weißliche, glasige Schicht. Nach 24 Stunden dickere, glatte, homogene, weißliche, etwas schleimige, nicht häutige Schicht. Nach drei Tagen wieder dünnere, marmorierte, weißliche Schicht. Im Alter ist die Schicht graubraun.

Wir untersuchen nun die Entwickelungsgeschichte der Kolonie genau mikroskopisch. Wir beginnen mit der Untersuchung der sieben bis acht Stunden alten Kultur, in Anschluß an die Untersuchung der Sporenkeimung. Dazu setzen wir die Kultur am besten morgens 7 Uhr an, um sie nachmittags 3 Uhr untersuchen zu können. Wir finden vorherrschend bis achtstäbige Zellfäden, deren Stäbe 2- bis 3-lang und noch völlig fettfrei sind.

Von nun an beginnt teilweise der Zerfall der Zellfäden in kürzere Stücke und Einzelstäbchen und die Fettspeicherung, so daß nach sechzehn Stunden meist Einzelstäbchen und zwei-, vier-, selten acht- und mehrstäbige Zellfäden vorhanden sind, deren Stäbe zwei-, selten bis vierlang sind (also viermal länger als ein Sporangium des Pilzes von normaler Länge) und Fett gespeichert haben; im Kondenswasser sind noch viele Schwärmoidien in lebhafter Bewegung.

Wir untersuchen nun eine 20 bis 24 Stunden alte Kultur (angesetzt morgens 7 bis 9 Uhr, untersucht gegen 10 Uhr des nächsten Tages).

Wir entnehmen zuerst eine Spur der Kolonie von der Basis und untersuchen sie in etwas Kondenswasser. Wir finden nur Ruhestäbchen, welche meist ein- bis zweizellig und ein- bis zweilang sind, teilweise etwas angeschwollen und reichlich mit Fetttropfen versehen sind. Wir wollen jetzt das Verhalten des Fettes und der fetterfüllten Stäbchen gegen einige Reagentien studieren.

Methylenblaulösung 1+10. Wir bringen sehr wenig Bakterienmaterial mit der Öse in ein Tröpfchen Wasser und unter das Deckglas. Wir setzen seitlich einen Vierteltropfen der Lösung an den Rand des Deckglases und beobachten die Grenze zwischen der farblosen Flüssigkeit und der eindringenden Farbstofflösung. Wir sehen, je nach der Art, in welcher die Farbstofflösung mit den Stäbchen in Berührung tritt und wohl auch je nach der Beschaffenheit der Membran, folgende Bilder. 1. Die äußere Membran und die derselben eventuell anliegenden Zellkerne werden allein gefärbt (Fig. 16). 2. Die Membran, der Protoplast und die Kerne werden gleichzeitig mehr oder weniger gefärbt (Fig. 17). 3. Die Membran wird kaum gefärbt, der Protoplast stark (Fig. 18); manchmal tritt die Plasmaverbindung, welche die Querwände durchsetzt, deutlich hervor. Die Tropfen werden niemals gefärbt.

Methylenblaulösung 1 + 10, einprozentige Schwefelsäure und angetrocknetes Material. Wir verfahren, wie es in Kapitel XIII angegeben wurde, um das Volutin nachzuweisen, finden aber keine Volutanskugeln. Die Sporenanlagen bleiben am längsten blau gefärbt.

Methylenblaulösung *v*. Wir fixieren die Bakterien mit sehr wenig Formol wie bei der Formolfuchsinmethode und setzen dann einen Tropfen Methylenblaulösung *v* hinzu. Nach fünf bis zehn Minuten sehen wir das Zytoplasma schön blau gefärbt, die Fetttropfen dagegen gänzlich ungefärbt und scharf hervortreten.

Sudanlösung oder Gelblösung. Wir bringen eine Spur der Bakterien in ein Tröpfchen Wasser und setzen dann eine Spur, eine halbe Öse voll, Sudanlösung oder Gelblösung hinzu, die wir mittelst der Platinöse gut unter das Wasser rühren. Wir sehen jetzt die Fetttropfen gelb oder rot gefärbt, das Zytoplasma nicht. Sudan und Dimethylamidoazobenzol lösen sich sehr leicht in Fett und färben dasselbe intensiv.

Methylenblau-Sudan-Methode. Wir bringen ein Tröpfchen Formol auf den Objektträger, setzen eine Öse voll des Bakterienmaterials hinzu, mischen sehr sorgfältig und lassen das Formol fünf Minuten wirken. Hierauf fügen wir einen Tropfen Methylenblau *v* hinzu, rühren um und lassen zehn Minuten stehen; dann setzen wir eine Öse voll einer frisch bereiteten Mischung von einem Tropfen Sudanlösung und einem Tropfen Wasser hinzu. Es färbt sich so das Zytoplasma und hie und da der Zellkern blau, und man kann eventuell im Zytoplasma farblose Zellsaftvakuolen sehen, wenn in einer Zelle das Fett fehlt oder in geringer Menge vorhanden ist. Die Fetttropfen sind rot gefärbt. Schwach rötlich kann die Membran gefärbt werden und eventuell die Sporenmembran, wenn Sporen vorhanden sind.

Jodjodkaliumlösung *k*. Wir setzen eine Spur der Lösung seitlich zu dem in einem Tröpfchen Wasser verteilten, unter dem Deckglase liegenden Materiale. Wir beobachten an der Grenze zwischen Wasser und Jodlösung. Die Fetttropfen werden gelb, dann braun gefärbt, ehe das Zytoplasma tingiert wird. Später färbt sich auch der Protoplast braun, und die Struktur wird mehr oder weniger unklar.

Wir haben also jetzt gesehen, daß sich das Fett mit Methylenblaulösung nicht, mit Sudan- oder Gelblösung oder Jodjodkaliumlösung leicht färbt.

Schon in dem oberen Teile der 20 bis 24 Stunden alten Kolonie trifft man meist Sporangien an. Zahlreicher sind die Sporangien in Kulturen, die 36 Stunden alt sind, und deren Eigenschaften wir jetzt untersuchen wollen. Wir beachten die noch immer vorhandenen Verschiedenheiten in dem Verhalten der verschiedenen Höhenregionen der Kultur. Wir finden meist Einzelstäbe bis vierstäbige Zellfäden, darunter normale Sporangien in verschiedenen Entwickelungsstadien. Manchmal sind die Stäbchen relativ kurz und gerundet. Oft sind vielstäbige Zellfäden, deren Stäbe stark angeschwollen, oft kugelig abgerundet sind und teilweise Sporen enthalten, häufig. Nicht selten sind die Endstäbchen dieser Zellfäden etwas zugespitzt.

Zuerst suchen wir nach möglichst normalen, schlanken Sporangien in dem unteren Teile der Kultur (oder in dem oberen Teile einer 24stündigen Kultur, wenn sie zufällig in der 36stündigen Kultur nicht gut aufzufinden wären) und beobachten sie in Wasser. In jungen

Sporangien sieht man die Fetttropfen gleichmäßig verteilt. Bei sorgfältigem Suchen finden wir Sporangien, bei denen eine Sporenvakuole, die noch relativ schwach lichtbrechend ist, eben entstanden ist und das Fett zurückgedrängt hat, so daß ein trophischer, Fett führender Teil und ein fertiler Teil im Sporangium zu erkennen ist (Fig. 19). In anderen Sporangien ist die Vakuole etwas stärker lichtbrechend als das fettführende Zytoplasma (Fig. 20), und in anderen sieht man im fertilen Teile die junge Spore sehr zart abgegrenzt liegen (Fig. 21). Schließlich finden wir die junge, noch membranfreie Spore scharf abgegrenzt, stark lichtbrechend, meist von einem schwach lichtbrechenden Hofe umgeben (Fig. 22), das Fett fast verbraucht. Die fertigen Sporangien enthalten eine stark lichtbrechende, von der Membran umgebene Spore. Wir zeichnen einige der Entwickelungsstadien der Sporangien bei tiefer Einstellung.

Färben nach der Methylenblau-Sudan-Methode. Wir behandeln nun Sporangienmaterial nach der Methylenblau-Sudan-Methode, um zu beobachten, wie sich die verschiedenen Entwickelungsstadien der Sporen bei dieser Färbung verhalten. Wir finden, daß sich membranlose Sporenanlagen blau (Fig. 23), die schon behäuteten Sporen, infolge der Färbung der Membran, rot (Fig. 24 u. 25) färben. Zugleich erscheint das Zytoplasma blau. Wir finden in schon reifen Sporangien noch Zytoplasma. Das Fett verschwindet mit der Reife der Spore mehr und mehr. Hie und da sieht man einen blau gefärbten Zellkern.

Chloralhydratlösung. Wir haben gesehen, daß sich Fetttropfen und fertige Sporen durch Sudan rot färben, und daß Fetttropfen und Sporen sich manchmal recht ähnlich sehen. Man unterscheidet beide Gebilde leicht, wenn man das Bakterienmaterial in Chloralhydrat untersucht, was wir jetzt thun wollen. Wir bringen eine Spur des möglichst wenig nassen Materials in einen Tropfen Chloralhydratlösung und rühren mit der Platinöse gut um. Die Bakterien erscheinen jetzt fast homogen; das Fett ist gelöst oder wenigstens völlig unsichtbar geworden, die Sporen treten scharf hervor.

Formol-Fuchsin-Gelb-Methode. Einen guten Einblick in die Verteilung der Zellkerne und des Fettes in den Sporangien gibt uns oben genannte Methode, bei welcher zugleich die membranfreien Sporen rot gefärbt werden. Wir färben zuerst nach der Formolfuchsinmethode, setzen dann etwa $^1/_{20}$ der im Präparate vorhandenen Flüssigkeit Gelblösung mit der Platinöse hinzu und rühren tüchtig um. Jetzt erscheinen unbehäutete Sporenanlagen rot (Fig. 26 u. 27), fertige Sporen (Fig. 28) schwach gelblich gefärbt. Das Zytoplasma ist hellrot, die Kerne (Fig. 26 *a* u. *b*) sind tiefrot gefärbt, das Fett gelb.

Wir wenden nun noch den in Lösung begriffenen Zellfäden, die immer, meist in Massen zusammenliegend, in älteren Kulturen zu finden sind, unsere Aufmerksamkeit zu. In den Kolonien, in denen die Individuen so dicht beieinander liegen, werden schwächere Individuen bald krank und sterben schließlich ab. Es beginnt dabei anscheinend bald ein Aussaugen, schließlich Lösung derselben, unter Beihülfe lebhaft vegetierender Zellen der gleichen Kolonie.

Wir werden bei sorgfältigem Suchen bald Stäbchen finden, welche uns Absterbeerscheinungen aufweisen. Darunter treten als besonders auffallend solche hervor, welche in der Membran nur noch Fetttropfen, kein Plasma enthalten (Fig. 26 A).

Wir untersuchen zuerst in Wasser, dann nach der Formol-Methylenblau-Sudan-Methode, um uns über die eigenartigen Zusammenballungen des Zytoplasmas und über dessen Lösung, sowie über das Verhalten des Fettes zu orientieren. Es gelingt uns so auch leicht, die Membran im isolierten Zustande zu beobachten.

Kapitel XV.

Säure- und Alkalibildung in den Bakterienkulturen.

Litteratur.

Baginsky, *Zur Biologie der normalen Milchkotbakterien; Zeitschr. f. physiolog. Chemie 1888, XII, S. 434.* — **Banning,** *Zur Kenntnis der Oxalsäurebildung durch Bakterien; Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. VIII, No. 13, S. 395.* — **Beijerinck,** *Centralbl. f. Bakt. 1891, I. Abt., Bd. IX, p. 781.* — **Beijerinck,** *Ueber die Butylalkoholgärung; Verhandel. d. Koninkl. Akademie van Wettenschappen te Amsterdam II. Sect. 1893, Deel I, No. 10, S. 8.* — **Brieger,** *Ueber Spaltungsprodukte der Bakterien; Zeitschr. f. physiol. Chemie 1885, Bd. IX, S. 1.* — **Brieger,** *Ueber Spaltungsprodukte der Bakterien; Zeitschr. f. physiol. Chemie 1883/84, Bd. VIII, S. 306.* — **Conrad,** *Bakteriologische und chemische Studien über Sauerkrautgärung; Archiv f. Hygiene 1897, Bd. XXIX, S. 56.* — **Emmerling,** *Ueber Spaltpilzgärung; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1900, Bd. XXXIII, S. 2477.* — **Emmerling,** *Die Zersetzung stickstofffreier organischer Substanzen durch Bakterien, Braunschweig 1902.* — **Glaser,** *Indikatoren der Acidimetrie und Alkalimetrie, Wiesbaden 1901.* — **Grimbert,** *Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus; Annales de l'Institut Pasteur 1893, Tom. VII, S. 353.* — **Guareschi,** *Einführung in das Studium der Alkaloide, Berlin, Heyfelder, 1896, I, S. 550.* — **Hellin,** *Das Verhalten der Cholerabacillen in aeroben und anaeroben Kulturen; Archiv für Hygiene 1894, Bd. XXI, S. 308.* — **Henneberg,** *Weitere Untersuchungen über Essigbakterien; Centralbl. f. Bakt. 1898, II. Abt., Bd. IV, S. 14.* — **Hilbert,** *Ueber die Steigerung der Giftproduktion der Diphtheriebacillen bei Symbiose mit Streptokokken; Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten 1898, Bd. XXIX, S. 157.* — **Hoyer,** *Beiträge zur Kenntnis der Essigbakterien; Sonderabdruck aus „Die Deutsche Essigindustrie" 1899.* — **Lafar,** *Physiologische Studien über Essiggärung und Schnellessigfabrikation; Centralbl. f. Bakt. 1895, II. Abt., Bd. I, S. 129.* — **Madsen,** *Zur Biologie des Diphtheriebacillus; Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten 1897, Bd. XXVI, S. 157.* — **Schardinger,** *Ueber das Vorkommen Gärung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurteilung derselben; Ref. Bakt. Centralbl. 1894, I. Abt., Bd. XV, S. 48.* — **Zopf,** *Oxalsäurebildung durch Bakterien; Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1900, Bd. XVIII, S. 32.*

A. Allgemeines über die Titerbildung.

Die Nährsubstrate, in welchen die Bakterien wachsen, verändern meist nach kurzer Zeit ihre Reaktion, indem saure oder alkalische Stoffwechselprodukte der Bakterien in sie hinein gelangen; sie verändern ihren Titer. Die Reaktionsveränderungen werden selbstverständlich bei einer bestimmten Spezies unter ganz bestimmten äußeren Verhältnissen einen charakteristischen Verlauf nehmen; sie werden aber anscheinend schon von sehr kleinen Schwankungen der äußeren Verhältnisse erheblich beeinflußt, da die Bildung sehr verschiedener Stoffwechselprodukte unter sehr nahe verwandten Umständen eintreten kann.

Säuren sehr verschiedener Art spielen unter den Stoffwechselprodukten wohl deshalb eine große Rolle, weil sie als Waffen im Kampfe um den Nährboden für die einzelnen Spezies recht brauchbar sein werden. Man hat bisher folgende Säuren häufig nachgewiesen:

Ameisensäure H—COOH. Das Vorkommen der Ameisensäure unter den Stoffwechselprodukten der Bakterien wird vielfach beschrieben. GRIMBERT (Ann. Pasteur XCIII, 353) fand, daß sein Bac. orthobutyricus manchmal wenig Ameisensäure neben Butylalkohol, Buttersäure, Essigsäure, Isobutylalkohol, Kohlensäure und Wasserstoff bildete. RENSCH (Pharm. Zeit. XXXIX, 864) beobachtete, daß ein Spaltpilz aus Glyzerin Aethylenglykol und Ameisensäure bildete. SOMMERFELD (Arch. f. Kinderhk. XXII, 226) fand Ameisensäure neben Alkohol, Milchsäure, Bernsteinsäure und Kohlensäure beim Wachstum eines Kolibazillus in Milchzucker. Nach WOOD and WILCOX erzeugte Bacillus furfuris Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure u. s. w.

Essigsäure CH^3—COOH wird von manchen Bakterien als einzige Säure aus bestimmten Nährstoffen gebildet. So erzeugen Bacillus industriens, oxydans, acetigenus, Bacterium aceti, acetosum, Kützingianum, Pasteurianum, xylinum aus Dextrose, Aethylalkohol, Propylalkohol, Glykol wesentlich Essigsäure (HENNEBERG). Auch die Pneumoniekokken erzeugen aus Rohrzucker und Traubenzucker, ebenso aus milchsaurem Kalke Essigsäure (BRIEGER 1883/84, S. 310). Andere Bakterien bilden Essigsäure neben größeren Mengen anderer Säuren. GRIMBERT's (A. d. l'Inst. Past. XCIII, 353) Bac. orthobutylicus bildete z. B. neben Buttersäure und Butylalkohol auch Essigsäure.

Propionsäure C^2H^5—COOH bildete nach BRIEGER (1883/84, S. 309, 1885, S. 3) ein Bacillus aus Dextrose als Hauptprodukt.

Kapronsäure C^5H^{11}—COOH bildete Bacillus Fitzianus nach FITZ neben Aethylalkohol, Buttersäure und Essigsäure.

Buttersäure $CH^3(CH^2)_2$—COOH bildet z. B. BEIJERINCK's (1893) Granulobacter saccharobutyricum aus Dextrose oder Maltose neben Butylalkohol, Kohlensäure und Wasserstoff. DUCLAUX (Ann. Past. IX, 811) fand, daß sein Amylobacter butylicum aus Dextrose Buttersäure neben Butylalkohol, Alkohol, Essigsäure herstellte. Bei EMMERLING (1902) findet sich eine Zusammenstellung der Buttersäurebildner S. 109. Verarbeitet kann zu Buttersäure werden: Dextrose, Saccharose, Milchzucker, Glyzerin, Mannit, Erythrit, Querzit, Sorbose, Arabinose, milchsaurer Kalk, glyzerinsaurer Kalk u. s. w.

Bernsteinsäure $C^2H^4(COOH)^2$. EMMERLING (Berl. Ber. XXXII, 2477 1900) zeigte, daß Bac. lactis aerogenes aus Milchzucker neben Essigsäure auch Bernsteinsäure bildete. Auch FITZ, ferner FRANKLAND (Proc. Lond. 1889, 345) und BLUMENTHAL (VIRCH. Archiv CXLVII, S. 165) wiesen die Säure in Bakterienprodukten nach.

Milchsäure CH^3—CH(OH)—COOH. Eine Zusammenstellung der milchsäurebildenden Bakterien hat EMMERLING (1902, S. 53) gegeben, ebenso ist dort (S. 53) die Methode der Darstellung der Milchsäure kurz geschildert. Als Nebenprodukte bei der Milchsäurebildung, sind nachgewiesen Alkohol, Kohlensäure, Essigsäure, Ameisensäure, Buttersäure, Isovaleriansäure, Bernsteinsäure, Wasserstoff, Methan, Butylalkohol. Man unterscheidet bekanntermaßen folgende Milchsäuren:

α-Oxypropionsäure CH^3—CH(OH)—COOH = Aethylidenmilchsäure,
davon inaktive Milchsäure (i),
linksdrehende „ (l),
rechtsdrehende „ (r),

β-Oxypropionsäure $CH^2OH - CH^2$—COOH = Aethylenmilchsäure.

Es scheint nun so, als werde nur die α-Säure von den Bakterien gebildet. Nur HILGERS (Ann. d. Chem. und Pharm. CLX, 336) will die

β-Säure einmal gefunden haben. VOHL (MALY's Jahrb. 1876, S. 274) hat die Versuche wiederholt, fand jedoch nur α-Säure. Von der α-Säure sind i-Säure, ferner r- und l-Säure (z. B. SCHERDINGER 1894, aus Rohrzucker) nachgewiesen worden.

Oxalsäure $(COOH)^2 + 2H^2O$. ZOPF (1900, dazu BANNING, 1902) fand, daß Essigbakterien und einige andere Spezies Krystalle von Kalziumoxalat im Substrate bilden können. Als Nährboden diente wesentlich Pepton-Fleischextrakt-Gelatine, der verschiedene Kohlehydrate u. s. w. zugesetzt wurden. Bac. Pasteurianum konnte z. B. Oxalat bilden mit Dextrose, Saccharose, Dextrin, Aethylenglykol, Glyzerin, Isobuttersäure, Glykolsäure, Malonsäure, Brenzweinsäure. Das Oxalat wird innerhalb der Kolonien oder in nächster Umgebung derselben meist in Form von Oktaedern abgelagert, und seine Entstehung auf Dextroseagar könnte als Kennzeichen der Spezies benutzt werden.

Bezüglich der basischen Stoffe, welche unter den Fäulnisprodukten organischer Stoffe gefunden worden sind, verweise ich auf die Zusammenstellung bei GUARESCHI (Einführung in das Studium der Alkaloide, Berlin, HEYFELDER 1896, S. 550). Dort finden sich auch Angaben über die Methoden der Isolierung dieser Körper. Es sind folgende Verbindungen hervorzuheben, welche als Bakterienprodukte zu bezeichnen sind. Ich werde stets zuerst den Autor, dann das Substrat, aus dem die Base gewonnen wurde, anführen:

Ammoniak NH^3: BRIEGER, Staphylococcuskultur. **Amine:** Methylamin: BOCKLISCH, Heringslake; Dimethylamin $(CH^3)_2NH$: BRIEGER, faule Gelatine; Trimethylamin $(CH^3)_3N$: GUARESCHI und MOSSO, faules Gehirn; Aethylamin $C^2H^5.NH^2$: faule Bierhefe; Diäthylamin $(C^2H^5)^2$-NH: EHRENBERG, Bakterienkulturen; Triäthylamin $(C^2H^5)^3N$: BRIEGER, fauler Stockfisch; Isoamylamin $(CH^3)^2 \cdot CH \cdot CH^2 \cdot CH^2 - NH^2$: faule Bierhefe; Kaproylamin $C^6H^{13} \cdot NH^2$: HESSE, faule Hefe; Neurin: $(CH^3)_3N\langle{}^{CH=CH^2}_{OH}$: BRIEGER, faules Fleisch; **Diamine:** $C^2H^8N^2$: BRIEGER, faule Fische; Putreszin $\begin{matrix} CH^2 \cdot CH^2 \cdot NH^2 \\ | \\ CH^2 \cdot CH^2 \cdot NH^2 \end{matrix}$: BRIEGER, menschliche Leichen. Kadaverin $CH^2\langle{}^{CH^2 \cdot CH^2 \cdot NH^2}_{CH^2 \cdot CH^2 \cdot NH^2}$: BRIEGER, faules Fleisch; Neuridin $C^5H^{14}N^2$: BRIEGER, faule Gelatine etc. **Hydramine:** Cholin $(CH^3)^3N\langle{}^{CH^2 \cdot CH^2 \cdot OH}_{OH}$; Muskarin $C^5H^{15}NO^3$: BRIEGER, fauler Stockfisch; Mydatoxin $C^6H^{13}NO^2$: BRIEGER, Leichen; **Guanidine:** Methylguanidin $HN=C\langle{}^{NH^2}_{NH \cdot CH^3}$: BRIEGER, Kulturen des Kommabazillus und Bacillus anthracis. **Amidosäuren:** Amidovaleriansäure $NH^2 \cdot CH^2 \cdot CH^2 \cdot CH^2 \cdot CH^2 \cdot COOH$: SALKOWSKI, faules Eiweiß. **Ptomaïne aus der Pyridin- und Hydropyridinreihe:** Hydrokollidin; Parvolin; Hydrokoridin $C^{10}H^{17}N$: GRIFFITHS, Kultur von Bact. allii. **Andere Basen unbekannter Natur:** Sukotoxin, Sukolotoxin, Tetanin, Tetanotoxin.

Von den Untersuchungsresultaten, die unter Benutzung von Reinkulturen gewonnen sind, mögen noch folgende hervorgehoben werden.

BRIEGER untersuchte 1888 die basischen Stoffwechselprodukte des Cholerabakteriums, welche aus Rindfleisch gebildet werden. Er fand Putreszin, Kadaverin, Cholin, Methylamin, Trimethylamin, Kreatinin, Methylguanidin und zwei andere Basen. Aus Reinkulturen von Streptococcus pyogenes ROSENBACH stellte BRIEGER Ammoniak und Trimethylamin her. BOCKLISCH konnte aus Kulturen von Vibrio Proteus, die mit Fleisch angesetzt waren, isolieren: nach 20 Tagen Methylguanidin, später noch Kadaverin und Kreatinin.

Bei Beurteilung des Vorganges der Bildung von Säuren und Basen in den Kulturen sind folgende Momente vornehmlich zu berücksichtigen.

1. Die unter bestimmten äußeren Verhältnissen gebildete Art und Menge der Säuren ist selbstverständlich in erster Linie abhängig von den Eigenschaften der wirksamen Spezies.

So fand z. B. BANNING, daß auf Nährgelatine mit Rohrzucker Bact. acetosum Oxalat bildet, Bact. Kützingianum nicht, daß Bact. aceti aus Aethylenglykol Oxalat bildet, Bact. oxydans nicht, daß aus Glykolsäure Bact. aceti Oxalat bildet, Bact. industrium nicht u. s. w.

1 a. Wenn man mit einer Öse von Material bestimmten Alters impft, so stellen sich, da die Menge des Impfmaterials so nicht absolut genau bemessen werden kann, wohl anfangs kleine Schwankungen ein, doch gleichen sich diese bald aus (HOYER 1899, S. 56).

2. Die Art und Menge der gebildeten Säuren und Basen wird meist für eine Spezies verschieden ausfallen, wenn das Nährsubstrat in seiner Zusammensetzung verändert wird. So erzeugt nach BANNING Bacterium aceti auf Nährgelatine mit 1 % Pepton und 1 % Fleischextrakt, bei Zusatz der folgenden Stoffe kein (0), mäßig reichlich (1), reichlich (2), sehr reichlich (3) Kalziumoxalat: Dextrose 1, Lävulose 2, Galaktose 0, Maltose 0, Rohrzucker 1, Milchzucker 0, Raffinose 0, Rhamnose 1, Arabinose 3, Stärke 0, Isolichenin 1, Inulin 0, Glykogen 0, Dextrin 0, Gummi arabicum 0, Methylalkohol 0, Aethylalkohol 0, Propylalkohol 0, Butylalkohol 0, Amylalkohol 0, Aethylenglykol 3, Glyzerin 2, Erythrit 3, Mannit 0, Dulzit 0, Ameisensäure 0, Essigsäure 0, Propionsäure 0, Buttersäure 0, Isobuttersäure 1, Baldriansäure 0, Glykolsäure 3, Milchsäure 0, Malonsäure 2, Bernsteinsäure 0, Brenzweinsäure 2, Äpfelsäure 0, Weinsäure 0, Zitronensäure 0, Glykokoll 0, Sarkosin 0, Leuzin 0, Harnstoff, Harnsäure, Kreatin, Kreatinin, Benzoesäure, Hippursäure, Salizylsäure, Tyrosin 0.

Nach BAGINSKY (Z. f. physiol. Chemie XII, 434) bildete ein Bact. lactis aerogenes, welches er aus Milchkot isolierte, aus Milchzucker (36 g Milchzucker, 8 g Pepton, 1,6 Dikaliumphosphat, 0,15 Kalziumchlorid, 0,3 Magnesiumsulfat und Kalziumkarbonat) hauptsächlich Essigsäure, daneben wenig Azeton und wenig Milchsäure, aus milchsauren Salzen höchst wahrscheinlich wesentlich Buttersäure (S. 448). Nach EMMERLING erzeugte Bacillus lactis aerogenes aus Milchzucker Essigsäure und Bernsteinsäure, aus Glukose i-Milchsäure und Essigsäure, in beiden Fällen auch sehr wenig Alkohol, aus Mannit viel Bernsteinsäure, viel Alkohol (15 aus 100 Mannit) und wenig flüchtige Säuren. TATE (Journ. Amer. Soc. LXII, 1263) zeigte, daß bei Vergärung der Dextrose durch einen Spaltpilz aus 9 Mol. Dextrose = 2 Mol. Alkohol, 1 Mol. Bernsteinsäure, 7—8 Mol. l-Milchsäure, aus Rhamnose (eine Methylpentose) = 5 Mol. Essigsäure, 4 Mol. i-Milchsäure bildete. GRIMBERT (Ann. Pasteur IX, 840) erhielt durch Pneumoniekokken aus

	Alkohol	Essigsäure	l-Milchsäure	Bernsteinsäure
100 Th. Saccharose	Spur	29,5	34,6	
100 Th. Laktose	13—16	21—30	0	23—27
100 Th. Arabinose	0	36,1	49,9	0

3. Es können schon kleine Mengen von Stoffen im Nährsubstrate, welche nicht als Nährstoffe zu bezeichnen sind, den Verlauf der Säuerung in einer Kultur ändern. So z. B. hängt die Energie und Art der Säurebildung manchmal sehr wesentlich von der anfänglichen Reaktion des Nährbodens ab. MADSEN (1897) untersuchte die Titer von Reinkulturen eines Diphtheriebazillus, die mit Kalbsbouillon hergestellt worden waren, eingehend. Normalerweise wird eine solche Kultur erst mehr und mehr sauer, dann nimmt die Säuerung ab, schließlich reagiert die Kultur mehr und mehr, bis zu einer gewissen Grenze, alkalisch. Wenn man nun die Bouillon von vornherein recht sauer macht, so nimmt die Säurebildung in diesen Kulturen mehr und mehr zu, bleibt aber schließlich auf einem gewissen Punkte stehen; macht man die Bouillon von vornherein möglichst alkalisch, so entwickelt sich ihr Titer stets normal. Bei Bouillon mit von vornherein zwischenliegenden Titern ist das Verhalten der Kulturen wechselnd. HILBERT's Untersuchungen (1898) bestätigen die Angaben MADSEN's.

Hier liegt die Sache wohl so, daß die im Anfang des Wachstums der Kultur stattfindende Säurebildung bald zum Stillstand des Wachstums führt, so daß ältere Oidien nicht mehr zur Wirkung kommen können oder Stoffwechselprodukte, welche schließlich zu Basen verarbeitet werden, nicht gebildet werden können.

GRIMBERT (1893) fand, daß in sich mehr und mehr säuernden Kulturen an Bacillus orthobutylicus relativ viel Butylalkohol und relativ wenig Säure gebildet wird. Hält man das Substrat mit Kreide neutral, so wird relativ wenig Alkohol und relativ viel Säure erzeugt.

Glyzerin ohne Kreide gab in 52 Tagen für 1 g Glyzerin:

0,643 Butylalkohol,
0,026 Essigsäure,
0,153 Buttersäure,
Spuren Milchsäure.

Glyzerin mit Kreide gab in 52 Tagen für 1 g Glyzerin:

0,075 Butylalkohol,
0,025 Essigsäure,
0,228 Buttersäure,
Spuren Milchsäure.

HENNEBERG (1898, S. 146) fand, daß Bacillus aceti in Biere, welches mit 1 % PO^4H^2K versetzt war, mehr Essigsäure erzeugte als in unversetztem Biere.

PÉRÉ (Ann. Past. XII, 63—72) fand, daß Bact. coli bei Zusatz von 5 pro mille Phenol zur Nährlösung aus Mannose statt l-Milchsäure r-Milchsäure bildete.

4. Die Temperatur, bei welcher eine Kultur wächst, ist selbstverständlich von großer Bedeutung für die Titerbildung. HENNEBERG (1898, S. 72) brachte je 25 ccm sterilisiertes Lagerbier mit ½ ccm Alkohol in Erlmeyerkölbchen, impfte mit möglichst gleich viel einer Kultur von B. aceti etc. und ließ die Kölbchen bei 33, 26—29° und bei 15° stehen. Die Titration ergab nach dem 3. und 7. Tage folgenden Prozentgehalt an Essigsäure in der Flüssigkeit.

	33°		26—29°		15°	
	3. Tag	7. Tag	3. Tag	7. Tag	3. Tag	7. Tag
B. oxydans	0,04	0,06	0,19	1,36	0,13	0,05
B. acetosum	0,05	0,08	4,48	4,57	2,3	4,32
B. aceti	0,03	0,04	4,19	3,88	0,09	1,27
B. Kützingianum	0,04	0,05	4,17	—	0,67	2,89
B. Pasteurianum	0,02	0,04	2,57	3,68	0,05	0,08

Dabei ist zu bemerken, daß das Temperaturoptimum für das Wachstum nicht mit dem für die Oxydationswirkung zusammenfällt, denn wir sahen das Optimum für das Wachstum von B. aceti, Pasteurianum, Kützingianum bei 45° liegen.

5. Die Sauerstoffmenge, welche den Bakterien zur Verfügung steht, kann von größtem Einflusse auf die Titerbildung in der Kultur sein. HELLIN (1894, S. 308) fand, daß Lackmusmolke, die mit Massauacholera infiziert war, bei anaerober Behandlung sich rötete, bei genügender Luftzufuhr sich bläute. Jedoch fand CONRAD (1897, S. 64), daß sein Bacterium brassicae acidae bei 22° in einer Krautabkochung (1 + 2), der 5 % Kochsalz zugesetzt worden war, die gleiche Menge Säure produzierte, ob es bei Sauerstoffzutritt oder bei Sauerstoffabschluß wuchs.

HOYER (1899, S. 51) fand, daß in Kölbchen, die mit Wattepfropfen verschlossen waren, die Versäuerung viel unregelmäßiger verlief, als in Bechergläsern, welche mit einer Glasplatte bedeckt waren; auch die Höhe der Flüssigkeitssäule war von Einfluß (S. 54).

6. Es kann bei der Säurebildung eine Säure fast ausschließlich beteiligt sein, oder es können mehrere Säuren entstehen. Manche Essigbakterien erzeugen z. B. fast nur Essigsäure aus Alkohol.

Der Bacillus orthobutyricus von GRIMBERT erzeugte, neben Spuren von Ameisensäure, Buttersäure und Essigsäure (1893, S. 363).

7. Der Titer und die Natur der gebildeten Säuren kann während des Verlaufes der Entwickelung einer Kultur, unter konstanten äußeren Bedingungen sich verändern.

GRIMBERT (1893, S. 353) fand für seinen Bac. orthobutylicus, daß das Verhältnis zwischen den entstehenden Säuren (Buttersäure + Essigsäure) einerseits und dem Butylalkohol andererseits sich beim Altern der Kulturen mehr und mehr zu Ungunsten der Säurebildung entwickelte. In einer Lösung von 5,85 g Invertzucker, 0,25 g Pepton auf 100 g mineralische Nährlösung (mit Kreide versetzt), verlief die Säureproduktion folgendermaßen:

	1 Tag		4 Tage		10 Tage		8 Monate	
Zuckerverbrauch	15 %		43 %		56 %		90 %	
			1 g Zucker gab					
Butylalkohol	0,015		0,059		0,069		0,108	
Essigsäure	0,313	0,878	0,114	0,537	0,110	0,515	0,046	0,321
Buttersäure	0,464		0,423		0,404		0,275	

LAFAR (1895) fand, daß in einer Kultur von Bact. Pasteurianum in 125 ccm Lagerbier, bei 33°, der Essigsäuregehalt bis zum 7. Tage fortgesetzt anstieg, dann bis zum 38. Tage fast bis auf 0° allmählich hinabsank.

Dieses Verhältnis beruht hauptsächlich darauf, daß die gebildete Essigsäure von dem Spaltpilze weiter zu Kohlensäure verarbeitet wird. LAFAR fand, daß die Entsäuerung in dem eben beschriebenen Falle

schon begann, als noch ziemlich viel Alkohol in der Nährflüssigkeit vorhanden war. Im allgemeinen wird ferner die Veränderung des Nährbodens eine veränderte Arbeitsweise der Spezies herbeiführen können, und das Vorherrschen der verschiedenen Morphoden der Spezies in den verschiedenen Entwickelungsstadien der Kultur kann von Einfluß sein. Die ausgeschiedenen Säuren können später auch noch zu anderen Stoffen als zu Kohlensäure verarbeitet werden, und es können mit den Säuren zugleich Basen gebildet werden, welche die Säuren mehr oder weniger ausgiebig neutralisieren.

Aus dem Gesagten erkennen wir, daß die Titerbildung in den Kulturen| das Resultat von komplizierten Stoffwechselvorgängen ist. Diese Stoffwechselvorgänge nehmen unter bestimmten äußeren und inneren Verhältnissen einen bestimmten Verlauf. Es gelangen in die Nährlösungen die mannigfaltigen Exkrete, die in diesen Prozessen gebildet werden, und ihr Verhalten gibt den Hauptgrund für die Titerbildung. Zugleich können allerdings kleinere oder größere Mengen von Stoffen, die aus den absterbenden Individuen austreten, dabei mitwirken. Die ganze wissenschaftliche Aufgabe, von welcher die der Bestimmung des Titers ein kleiner Bruchteil ist, wäre also die Bestimmung aller täglich im Verlaufe der Entwickelung der Kultur von den Bakterien ausgeschiedenen Stoffe in qualitativer und quantitativer Beziehung, der anorganischen und organischen, fest ausgeschiedenen, gelösten und gasförmigen Stoffe, welche täglich aus den ursprünglichen Stoffen der Nährlösung gebildet werden. Das Resultat könnte durch Vergleich der Trockensubstanz- und Titerbildung mit der Analyse kontrolliert werden. Eine auch nur annähernd das Ziel dieser Aufgabe erreichende Untersuchung würde natürlich ein vortreffliches Speziesmerkmal abgeben. Wir können uns hier nur mit der Bestimmung des Titers beschäftigen.

B. Allgemeines über die Bestimmung des Titers der Bakterienkulturen.

Der Indikator, den man zur Feststellung des Titers benutzt, ist von großer Bedeutung für das Resultat, welches man bei der Titrierung erhält, da der Indikator nur dadurch seine Farbe verändert, daß er mit den zu titrierenden Säuren oder Basen Verbindungen eingeht. Will man deshalb in einer Mischung von verschiedenen sauren Körpern, wie sie in den sauren Kulturen meist vorhanden ist, auch die schwächsten Säuren mit titrieren, so muß man einen Indikator wählen, der sich noch mit der schwächsten Säure zu verbinden vermag, und dessen neutrale Farbe zugleich durch die Säure noch genügend verändert wird. Solche Indikatoren sind im allgemeinen Rosolsäure, Tropäolin 000, Kurkuma. Sie reagieren gut mit Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Kapronsäure, Ölsäure, Stearinsäure, Zitronensäure, Benzoësäure u. s. w., leichter noch mit Ameisensäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure. Lackmus reagiert schon mit Propionsäure schlecht.

Wendet man einen Indikator, der sich nur noch mit starken Säuren verbindet, mit schwachen nicht, an, so wird man diese schwachen Säuren in einem Gemische nicht mehr mit bestimmen, den Titer also relativ niedrig finden.

Ganz gleich verhält es sich bei der Titrierung von Basen. Indikatoren, welche sich noch mit schwachen Basen verbinden und einen genügend deutlichen Farbenumschlag zeigen, sind: Jodeosin, Tropäolin 00, Methyl- und Aethylorange, Helianthin, Dimethylamidoazobenzol, Kongo-

rot. Es sind das also die relativ stark sauren Indikatoren. Freies Ammoniak und noch schwächere Basen lassen sich nur mittelst der Indikatoren dieser Gruppe bestimmen, nicht mit den vorher genannten Indikatoren. Sehr schwache Basen, z. B. Anilin, lassen sich auch mit diesen Indikatoren nicht mehr absolut scharf bestimmen.

Wir benutzen zur Titrierung der Säuren Rosolsäurelösung: 0,5 Rosolsäure in 50 ccm Alkohol gelöst und 50 ccm Wasser hinzugefügt. Die Lösung ist gelbbraun, bleibt durch Säuren unverändert und wird durch Alkalien rosenrot. Man kann nur bei Tageslicht den Umschlag gut erkennen. Ammonsalze vermindern die Schärfe des Umschlages. Die Rosolsäuren des Handels sind durchaus nicht alle gleich empfindlich. Man versetzt 10 ccm Wasser mit 3 Tropfen der Indikatorlösung, fügt 0,5 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure hinzu und titriert mit $^1/_{10}$-Normalalkali zurück. Der Umschlag muß scharf erfolgen und darf nur einen Ueberschuß von einem Tropfen Lauge erfordern.

Fig. 24.

Fig. 25.

Fig. 24. Aufbewahrungsgefäße für Titerflüssigkeiten, bezogen von Franz Hugershoff in Leipzig.

Fig. 25. Giftpipette für 10 ccm. (Nach Arthur Meyer; siehe Archiv der Pharmacie 1882, S. 524; bezogen v. Hugershoff, No. 5714.)

Zur Titrierung der Basen benutzen wir Dimethylamidoazobenzol-Lösung 0,05 g Dimethylamidoazobenzol [$C^6H^5 \cdot N^2 \cdot C^6H^4N \cdot (CH^3)^2$] in 100 ccm 96proz. Alkohol gelöst. Die Lösung ist hellgelb und wird durch Säuren rot; schwefelsaure Alkalien und Ammoniak vermindern die Empfindlichkeit. Wir wenden $^1/_{10}$-Normalkalilauge und $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure zur Titrierung an.

Man kann 1 Liter Normalschwefelsäure und 1 Liter Normalkali von Merck beziehen, muß die Lösungen aber genau kontrollieren.

Man prüft die Normalkalilauge am besten mittelst reiner, wasserfreier Oxalsäure (Herstellung siehe Glaser, 1901, S. 34) unter Anwendung von Rosolsäure, verdünnt sie dann zu $^1/_{10}$-Normalkalilauge und prüft gegen diese die aus der Normalschwefelsäure durch Verdünnen hergestellte $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure unter Benutzung von Rosolsäure

genau auf ihren Titer. Als Endfärbung benutzen wir die Färbung, welche auftritt, wenn wir 10 ccm Wasser mit 3 Tropfen Rosolsäurelösung und 1 Tropfen $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure versetzen, und vergleichen stets direkt mit dieser Normalfarbe, wenn wir titrieren.

Zur Aufbewahrung der $^1/_{10}$-Normallösungen benutze ich die nebenstehend abgebildeten Gefäße mit Büretten (Fig. 24), die von HUGERSHOFF in Leipzig bezogen wurden und bei Berufung auf dieses Buch in der von mir genauer angegebenen Form geliefert werden. Das Gefäß für die Kalilauge wird durch eine mit Natronkalk gefüllte Röhre (Fig. 24 a [2]) abgeschlossen. Die Gummigebläse (mit denen die Lösungen hochgepumpt werden) reibt man am besten mit etwas Glyzerin ein und bewahrt sie in einem geschlossenen Glase auf, damit sie nicht zu bald brüchig werden.

Ferner brauchen wir noch eine 10 ccm-Messpipette, am besten eine sog. Giftpipette mit Marke für 10 ccm. Die Pipette (Fig. 25) ist aus Glas geblasen. Bei *o* befindet sich eine 2 mm weite Öffnung; diese verschließt man beim Aufsaugen einer Flüssigkeit mit dem Zeigefinger der rechten Hand, faßt mit Daumen und Mittelfinger das Rohr *r* und zieht dasselbe hoch. An *r* ist unten ein Stück Kautschukschlauch *s* festgebunden, welches sich an das innere Rohr fest anlegt und beim Gebrauche der Pipette etwas befeuchtet wird. Ist nach dem Emporziehen der Röhre *r* die innere Röhre mit Flüssigkeit bis zur Marke gefüllt, so lüftet man den Zeigefinger bei *o*, wonach die Flüssigkeit ruhig ausläuft.

Zuletzt sind noch einige Bechergläser von 4 cm Bodendurchmesser nötig.

Ehe man zu der genaueren Prüfung des Säure- resp. Basenbildungsvermögens einer Spezies übergeht, muß man zuerst über deren qualitatives Verhalten orientiert sein. Man kann schon in den Plattenkulturen die säurebildenden Spezies erkennen, wenn man, wie BEIJERINCK (1891), Gelatine benutzt, in welcher Kreide aufgeschwemmt ist. Durch statt der Kreide angewandtes Zinkkarbonat kann man sogar die Milchsäurebakterien ausschließen und den Essigsäurebakterien und anderen die Entwickelung allein gestatten. Wir setzen zur vorläufigen Orientierung über eine bestimmte Spezies dieselbe zuerst in Reagensgläsern mit verschiedenen Nährlösungen an und prüfen von 4 zu 4 Tagen mit empfindlichem, violettem oder rotem Lackmuspapier (sehr gut ist das „Lackmuspapier, einseitig Postpapier in Büchelchen“ der chemischen Fabrik HELFENBERG bei Dresden), indem wir mit der sterilen Öse Tröpfchen aus dem Reagensglase herausnehmen und auf das Papier aufsetzen. So erfahren wir, ob eine Spezies in einer oder der anderen Nährlösung Säure oder Alkali in erheblicher Menge bildet. Für einige Spezies, die wir vielleicht zu Versuchen herbeiziehen könnten, will ich nach GOTTHEIL hier gleich angeben, wie viel sie in 50 g unserer Nährlösungen in ungefähr 4 Wochen bei 28° Säuren und Basen, ausgedrückt in Kubikzentimetern von $^1/_{10}$-Normallösung, bilden.

Spezies	Nährlösung	Titer in $^1/_{10}$-Normallösung Säurebildung	Basenbildung
Bacillus ruminatus	V	2,5 ccm	
„ tumescens	VII	1,5 „	
„ graveolens	Vα	6 „	
„ Petasites	Vβ		43 ccm
„ Ellenbachensis	III		16 „
„ mycoides	III		20,5 „
„ subtilis	X		45 „
„ cohaerens	Vβ		36 „

Wenn wir also über das qualitative Verhalten einer zu untersuchenden Spezies orientiert sind, so suchen wir zu unseren Untersuchungen eine möglichst leicht konstant herzustellende Nährlösung aus, in welcher die Spezies gut wächst, und arbeiten nun weiter mit dieser.

Wir müssen dann zuerst weiter feststellen, welchen Titer die Nährlösung selbst hat, und dieses muß stets mit Hilfe desjenigen Indikators geschehen, den wir nachher bei der Titrierung benutzen wollen. Handelt es sich also um die Untersuchung eines säurebildenden Bakteriums, so müssen wir das Verhalten unserer Nährlösung gegen Rosolsäure feststellen. Wir gießen 10 ccm Wasser in ein Becherglas von 4 cm Bodendurchmesser, wie wir es stets zum Titrieren benutzen, setzen 3 Tropfen Rosolsäure (die Indikatorlösung!) und 1 Tropfen Kalilauge hinzu und stellen das Becherglas auf ein Stück weißes Papier. Hierauf bringen wir in ein gleiches Bechergläschen 10 ccm der Nährflüssigkeit und 3 Tropfen Rosolsäurelösung und vergleichen die Farbe dieses Gemisches mit der Farbe der Vergleichslösung. Ist die Farbe nicht so rot wie die der Vergleichslösung, ist die Lösung also sauer, so setzen wir so viel $^1/_{10}$-Normalkali hinzu, bis die rote Farbe der Vergleichslösung erreicht ist und bestimmen auf diese Weise den Titer der sauren Lösung. Ist die Farbe röter als die der Vergleichslösung, so titrieren wir mit $^1/_{10}$-Normalsäure bis zur richtigen Nuance und notieren diesen Titer.

Haben wir dagegen die Absicht, ein alkalibildendes Bakterium in einer Nährlösung wachsen zu lassen, so bestimmen wir den Titer der Lösung mittelst Dimethylamidoazobenzols („Gelb“). Wir stellen eine Vergleichslösung her, indem wir 10 ccm Wasser mit 3 Tropfen Gelblösung versetzen und 1 Tropfen Säure hinzufügen. 10 ccm der Nährlösung werden mit 3 Tropfen Gelblösung versetzt und die Farbe wird mit der Vergleichslösung verglichen. Ist die Lösung röter als die Vergleichslösung, so titriert man mit $^1/_{10}$-Normalkali zurück, bis genaue Gelbfärbung eintritt und bestimmt so den Titer; ist die Lösung gelb, so setzt man $^1/_{10}$-Säure bis zur Rotfärbung hinzu und titriert mit $^1/_{10}$-Normalalkali bis zur Gelbfärbung zurück. Als Vergleichslösung dient eine Lösung von 10 ccm Wasser, 3 Tropfen Gelblösung, 1 Tropfen $^1/_{10}$-Normalkali. Hat man so den Titer der Nährlösung festgestellt, so impft man 50 ccm der Nährlösung mit passendem Material der Spezies, läßt diese genügend lange Zeit bei konstanter Temperatur auf die Nährlösung einwirken und titriert dann 10 ccm der Nährlösung mit dem passenden Indikator, also bei saurer Lösung mit Rosolsäure, bei basischer Lösung mit Gelblösung, wieder. Nun wird der Ueberschuß an Säure oder Base in $^1/_{10}$-ccm-Normallösung für 50 ccm berechnet.

Bezüglich der Verwendbarkeit so gewonnener Zahlen für die Bestimmung der Spezies sagt GOTTHEIL (1901) in seiner unter meiner Leitung ausgeführten Arbeit:

„Wie vorauszusehen, zeigen die Resultate meiner Untersuchungen, daß für ein und dieselbe Spezies die unter den gleichen Bedingungen gebildeten Säure- und Alkalimengen variieren können. Beispielsweise erhielt ich für Bacillus pumilus, den ich von verschiedenen Nährböden isoliert hatte, folgende Resultate: I. Nach 6-wöchentlicher Entwickelung bei 28° in Nährlösung IV; 10 ccm = 8,5 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure. II. 1. Nach 4-wöchentlicher Entwickelung; 10 ccm = 6,6 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure. 2. Nach 6-wöchentlicher Entwickelung; 10 ccm = 2,8 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure. Es ist

also auf die Resultate der quantitativen Bestimmung meistens weniger Wert zu legen; doch ist der Nachweis, daß überhaupt Säure oder Alkali von einem betreffenden Bakterium in einer Lösung von konstanter Zusammensetzung, bei bestimmter Temperatur, nach bestimmter Zeit und in Kölbchen von gleicher Größe gebildet wird, als gutes Speziesmerkmal zu gebrauchen."

Hierzu ist jedoch zu bemerken, daß die Frage noch einer genaueren Durcharbeitung bedarf. und daß bei genauer Innehaltung aller Vorsichtsmaßregeln die Brauchbarkeit weiter zu gehen scheint, als hier angenommen worden ist.

Mit Berücksichtigung aller bisher besprochenen Momente stellen wir nun den folgenden Versuch an, unter Rücksichtnahme auf den Zweck, das Resultat des Versuches zur Charakterisierung der Spezies zu verwenden.

Uebung 15.

Titrierung der von Bacillus tumescens in einer Nährlösung erzeugten Säure.

Eine leicht konstant herzustellende Nährlösung für Bacillus tumescens ist Nährlösung VII. Auch Nährlösung V könnte, nach Vorversuchen, für die Versuche Verwendung finden. Der Spaltpilz wächst auch in Nährlösung I, doch ist diese, wegen des Gehaltes an Fleischextrakt und Pepton, nicht stets in gleicher Zusammensetzung herzustellen.

Für den Versuch verwenden wir Erlmeyerkölbchen, welche von Schott & Genossen in Jena bezogen werden können, von genau folgender Form. Sie sind 9 cm hoch, besitzen eine Halsweite von 2,5 cm, einen Hals von 1,5 cm Höhe, einen Boden von 8 cm Durchmesser. In drei solcher steriler Kölbchen wiegen wir je genau 50 g Nährlösung VII (Kaliumnitrat 1 g, Rohrzucker 0,5 g, Glycerin 1 g, zu mineral. Nährlösung 100 ccm), schließen mit dem sterilen Wattebausche und sterilisieren 15 Minuten im Dampftopfe. Wir impfen dann die Kölbchen mit je einer Öse voll einer Kultur von Bacillus tumescens. Diese Kultur wird mit abgekochtem Sporenmateriale hergestellt, welches von mindestens zehnmal auf D-Agar zur Sporenbildung gebrachtem Materiale herrührt. Sie muß 15 Stunden bei 28° gewachsen sein, damit sie gerade in kräftiger Oidienbildung begriffen ist.

Wir haben hiermit fünf Momente betont, welche für die Konstanz der Resultate von großer Wichtigkeit sind: 1. die Sauerstoffzufuhr, bestimmt durch die Form des Glases; 2. die Reaktion des Substrates, bestimmt durch die Zusammensetzung der Nährlösung; 3. die Art des Impfmaterials; 4. das Alter des Impfmaterials; 5. die Temperatur.

Wir untersuchen nun ferner nach acht Tagen, nach 14 Tagen und nach vier Wochen den Titer je eines Kölbchens in folgender Weise.

Wir bestimmen nach acht Tagen zuerst den Titer der Kultur. Wir prüfen mit Lackmuspapier und finden eine saure Reaktion. Um unsere Kulturflüssigkeit wieder auf ihr altes und auf ein konstantes Volumen zu bringen, gießen wir sie in einen Kolben von 50 ccm, spülen mit sehr wenig Wasser öfter nach und füllen mit dem Spülwasser den Kolben genau bis zur Marke auf. Mit der 10-ccm-Meßpipette (Giftpipette) bringen wir genau 10 ccm der Kulturflüssigkeit in

ein Becherglas, setzen drei Tropfen Rosolsäure hinzu und lassen, nach Ablesen der Bürette, $^1/_{10}$-Normalkali bis zum genauen Eintritt des durch die Kontrollösung (3 Tropfen Rosolsäure + 10 ccm Wasser + 1 Tropfen $^1/_{10}$-Normalkali) bestimmten roten Farbentons hinzufließen. Wir lesen ab. Wir wiederholen den Versuch dreimal. Wir brauchen beispielsweise für 10 ccm der Kulturflüssigkeit:

1.	0,55 ccm	$^1/_{10}$-Normalkali
2.	0,63 „	$^1/_{10}$ „
3.	0,6 „	$^1/_{10}$ „
Mittel	0,59 ccm	$^1/_{10}$-Normalkali.

Wir müssen nun noch feststellen, wie sich unsere Nährlösung ursprünglich gegen Rosolsäure verhält. Wir machen das in der auf S. 98 angegebenen Weise und finden dann z. B., daß die Nährlösung sich mit drei Tropfen Rosolsäure nur äußerst schwach nach Rot hin verändert, schwächer als eine gleiche Rosolsäurelösung, welcher wir einen Tropfen $^1/_{10}$-Normalkali hinzufügten. Dann könnten wir unsere Lösung als neutral betrachten und brauchten keine Aenderung an unserem Resultate vorzunehmen. Danach wären in 50 ccm der Nährlösung in acht Tagen eine 2,95 ccm $^1/_{10}$-Normalkali äquivalente Säuremenge gebildet worden.

In gleicher Weise untersuchen wir die 14-tägige und die vierwöchentliche Kultur und finden z. B.:

nach 14 Tagen die Säurebildung in 10 ccm = 0,68 ccm $^1/_{10}$-Normalkali
nach 4 Wochen die Säurebildung in 10 ccm = 0,88 ccm $^1/_{10}$ „

Das Resultat unserer Untersuchung könnten wir dann folgendermaßen zusammenfassen:

Säurebildung in 50 ccm Nährlösung VII, geimpft mit einer Öse 15 Stunden alten Materials von Bacillus tumescens.

Spezies	Nährlösung	Zeit	Temperatur	ccm $^1/_{10}$-Normallösung
B. tumescens	VII	8 Tage	28°	2,95
„	„	14 „	„	3,40
„	„	4 Wochen	„	4,40

Denselben Versuch kann man auch mit Bacillus asterosporus in Nährlösung V*a* anstellen. 10 ccm der Nährlösung gebrauchten bei Titrierung mit Rosolsäure ungefähr 0,75 ccm $^1/_{10}$-Normalkali. (Die Lösung reagierte dabei schwach alkalisch auf Lackmuspapier und brauchte bei Titrierung mit Gelblösung für 10 ccm 0,27 $^1/_{10}$-Normalsäure.) Nach acht Tagen gebrauchten 10 ccm ungefähr 1,16 ccm. Zieht man davon 0,75 ccm ab, so wäre danach in acht Tagen eine 0,41 ccm $^1/_{10}$-Normalkali entsprechende Säuremenge in 10 ccm entstanden. 50 ccm also = 2,05 ccm $^1/_{10}$-Normalkali.

In vielen Fällen bilden die Bakterien Alkali. In einem solchen Falle würden wir bei der Titrierung der Kulturflüssigkeiten ganz so verfahren wie vorher, nur würden wir als Indikator 3 Tropfen Dimethylamidoazobenzollösung hinzugeben, hierauf so lange $^1/_{10}$-Normalsäure zusetzen, bis die Lösung deutlich rot wäre und dann wieder so lange mit $^1/_{10}$-Natronlauge zurücktitrieren, bis gerade der Umschlag in Gelb erfolgte. Als Vergleichslösung für Beendigung der Reaktion dienten 10 ccm Wasser mit 3 Tropfen Gelblösung und 1 Tropfen Alkali. Zu Versuchen der Art können wir eine der von Gottheil untersuchten alkalibildenden Spezies wählen.

Kapitel XVI.
Die Gasbildung in Bakterienkulturen.

Litteratur.

Beijerinck, *Ueber Spirillum desulfurians als Ursache von Sulfatreduktion; Centralbl. f. Bakt. 1895, II. Abt., Bd. I, S. 1.* — ***Beijerinck,*** *Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgräben und Aufstellung der Gattung Aerobacter; Centralbl. f. Bakt. 1900, II. Abt., Bd. VI, S. 196.* — ***Conrad,*** *Bakteriologische und chemische Studien über Sauerkrautgärung; Archiv für Hygiene 1897, Bd. XXIX, S. 56.* — ***Grimbert,*** *Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus ses variations sous certaines influences biologiques; Annales de l'Institut Pasteur 1893, Bd. VII, p. 353.* — ***Hempel,*** *Gasanalytische Methoden, Braunschweig 1890.* — ***Hesse,*** *Ueber Gasaufnahme und -abgabe von Kulturen des Pestbazillus; Zeitschr. f. Hygiene u. Inf. 1897, Bd. XXV, S. 477.* — ***Hesse,*** *Ueber den Ursprung der in Kulturgläsern auftretenden Kohlensäure; Arch. f. Hyg. 1897, Bd. XXVIII, S. 307.* — ***Hesse,*** *Ueber die gasförmigen Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1893, Bd. XV, S. 17.* — ***B. Neumann,*** *Gasanalyse und Gasvolumetrie; Leipzig 1902, Hirzel.* — ***Perdrix,*** *Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau; Annales de l'Institut Pasteur 1891, p. 286.* — ***Petri und Maassen,*** *Weitere Beiträge zur Schwefelwasserstoffbildung aerober Bakterien und kurze Angaben über Merkaptanbildung derselben; Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1893, Bd. VIII, S. 490.* — ***Petri und Maassen,*** *Beiträge zur Biologie der krankheitserregenden Bakterien, insbesondere über die Bildung von Schwefelwasserstoff durch dieselben unter vornehmlicher Berücksichtigung des Schweinerotlaufs; Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1893, Bd. VIII, S. 318.* — ***Rubner,*** *Ueber den Modus der Schwefelwasserstoffbildung bei Bakterien; Archiv f. Hygiene, Bd. XVI, S. 53.* — ***Stagnitta-Balistreri,*** *Die Verbreitung der Schwefelwasserstoffbildung unter den Bakterien; Archiv f. Hygiene, Bd. XVI, S. 10.* — ***Winkler,*** *Lehrbuch der technischen Gasanalyse, Freiburg 1892.*

Allgemeines über die Gasbildung.

Nicht selten treten unter den Stoffwechselprodukten so große Mengen von Gasen auf, daß sie in Form von Gasblasen in den Kulturmedien aufsteigen und wir sie aufzusammeln vermögen. Es ist sehr leicht möglich, daß diese energische Gasentwicklung für manche Spezies von besonderer biologischer Bedeutung ist. Für jede Spezies ist die unter bestimmten äußeren Verhältnissen gebildete Gasmenge und Gasart höchst wahrscheinlich konstant, so daß wir die Gasbildung mit unter die Speziesmerkmale aufnehmen dürfen, wenn wir vorsichtig verfahren. Die Qualität und Quantität der erzeugten Gase ist sicher auch von den Faktoren abhängig, die wir bei der Säurebildung erwähnt haben, doch scheint es fast, als sei die Qualität des erzeugten Gases von äußeren Einflüssen weniger abhängig als die der erzeugten Säuren. Im allgemeinen sind wir jedoch über diese Frage noch wenig unterrichtet.

Von in größerer Menge in den Bakterienkulturen erzeugten und auffangbaren Gasen sind bekannt geworden Kohlensäure, Schwefelwasserstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Sumpfgas. Davon sind Kohlensäure und Schwefelwasserstoff relativ leicht löslich in Wasser und deshalb manchmal weniger auffallend, wenn sie nicht in großer Menge entstehen. Ein Volumen Wasser löst ungefähr 1 Vol. CO^2, 3—4 Vol. H^2S, 0,014 Vol. N, 0,019 Vol. H, 0,059 Vol. CH^4.

Bemerken will ich noch, daß einige starkriechenden, bei gewöhnlicher Temperatur nicht gasförmigen Körper sich oft durch den Geruch verraten, so Trimethylamin $N(CH^3)^3$, Merkaptane, z. B. Methylmerkaptan $CH^3—SH$ (bei 20° siedend), welches mittelst Isatin-Schwefel-

säure nachzuweisen ist (Morris, Archiv f. Hygiene XXX, S. 304; Petri und Maassen 1893, S. 498), das wie Naphthylamin riechende Indol

$$C^6H^4\begin{array}{c}\diagup CH \diagdown \\ \\ \diagdown NH \diagup\end{array}CH$$

(nachzuweisen durch die Rotfärbung, die es mit Natriumnitrit und Schwefelsäure annimmt) und das fäkal riechende Skatol.

Ueber die einzelnen Gase ist folgendes zu bemerken:

Kohlensäure bildet sich sowohl bei der normalen Sauerstoffatmung als auch bei der intramolekularen Atmung (Hesse 1893 u. 1897) der Bakterien, doch scheint bei der intramolekularen Atmung dieses Gas auch fehlen zu können, da Ad. Mayer (Centralbl. f. Bakt. 1892, Bd. XII, S. 99) bei einer Milchsäuregärung keine CO^2 fand.

Schwefelwasserstoff scheint nach den Untersuchungen von Stagnitta-Balistreri (1893) und Petri und Maassen (1893) von vielen Bakterienspezies in peptonhaltiger Bouillon gebildet zu werden. Gewisse Bakterien können aus Sulfaten Schwefelwasserstoff bilden (Beijerinck 1885), andere, wie z. B. der Granulobacter Beijerinck's, nicht; auch Sulfide und Thiosulfate können als Quellen für die Schwefelwasserstoffbildung dienen (Rubner 1893, S. 60; Beijerinck 1900, S. 104), und wenn man fein verteilten Schwefel ihren Kulturen zusetzt, so scheinen sehr viele Bakterien das Gas zu erzeugen.

Jedenfalls ist die Schwefelwasserstoffbildung sehr wesentlich bedingt durch die Art des Nährsubstrates. Nach Petri und Maassen (1893) bilden die 10 von ihnen untersuchten Spezies in Bouillon mit 5—10 % Pepton alle Schwefelwasserstoff, während in passender reiner Nährbouillon ohne Pepton Cholera und Schweinerotlauf keinen Schwefelwasserstoff erzeugten. Bei den hier genannten Untersuchungen wurde der Schwefelwasserstoff wesentlich nur an der Schwärzung erkannt, welche mit basischem Bleiacetat getränkte Papierstreifen über den Bakterienkulturen erlitten.

Beijerinck (1900, S. 196) wandte zur Erkennung der Schwefelwasserstoffbildner in Plattenkulturen mit Bleiweiß versetzte alkalisch reagierende Nährgelatine oder (1895, S. 108) einen Agar an, der neben Natriummalat, Asparagin und Kaliumphosphat und einer Spur Natriumkarbonat eine geringe Menge Mohrsalz ($SO^4FeSO^4(NH^4)^2$) enthielt. Stagnitta-Balistreri (1893) benutzten nach Fromme's Vorgang mit Eisensaccharat versetzte Gelatine, Morris Gelatine mit Bleizuckerzusatz.

Zur quantitativen Bestimmung wird das Schwefelwasserstoff enthaltende Gasgemenge über mit Kupfersulfatlösung getränkten, scharf getrockneten Bimstein geleitet und die Gewichtszunahme des letzteren bestimmt (Neumann, S. 101).

Stickstoff fanden z. B. Frankland, Stanley and Frew (Journ. chem. Soc. LIX, 253) in einem Gasgemische, welches die Pneumoniekokken Friedländer's aus Dextrose erzeugten. 3 g Dextrose lieferten 150 ccm Gas, welches 51,14 % CO^2, 0,07 % O, 47,41 % H und 1,38 % N enthielt.

Die Entwickelung von Wasserstoff ist sehr häufig beobachtet worden. Außer den eben genannten Beispielen sei zuerst erwähnt, daß das Bacterium brassicae acidae Conrad's (1897) Wasserstoff neben Kohlensäure, Methan (und Milchsäure) bildete. Oft scheint neben Wasserstoff nur noch Kohlensäure zu entstehen. So fand Beijerinck in den von seinem anaeroben Granulobacter saccharobutyricum und butylicum

erzeugten Gase nur Wasserstoff und Kohlensäure, ebenso PERDRIX (1891) bei seinem Bacille amylozyme, WINOGRADSKI bei seinem Clostridium Pastorianum, GRIMBERT (1893) bei seinem Bacillus orthobutylicus.

Methan erzeugte z. B. das Bacterium brassicae acidae von CONRAD (1897). Es bildete aus Weißkrautabkochung, der 5 % Kochsalz und 3 % Dextrose zugesetzt worden waren, durchschnittlich

		bei 20°	bei 35°
Vol. Proz.	CO^2	73	85
„ „	H	24	14
„ „	CH^4	3	1

CONRAD entfernte aus dem Gasgemische zuerst die CO^2 durch Kalilauge, dann den O durch Pyrogallol; er verbrannte hierauf den H durch Palladiumasbest, das Sumpfgas, mit reinem Sauerstoffe vermischt, in DREHSCHMIDT's Platinkapillare zu CO^2 und H^2O.

Wir haben bei der Besprechung der Säurebildung gesehen, daß die relativen Mengen der erzeugten Säuren während der Aufarbeitung einer begrenzten Menge von Nährsubstrat fortgesetzt wechseln. Ähnlich verhält es sich auch mit der Bildung von Gasen in begrenzten Mengen von Nährlösungen. Bei den folgenden Beispielen, die solche Spezies betreffen, welche nur H und CO^2 erzeugen, finden wir, daß anfangs die Produktion des H größer ist als die der CO^2, dann wächst aber die relative CO^2-Menge mehr und mehr und kann unter Umständen zuletzt die Menge des H übersteigen.

GRIMBERT (1893, S. 372) fand für seinen „Bacillus orthobutylicus", daß derselbe in einer Nährlösung, welche in 100 ccm mineralischer Nährlösung 0,25 g Pepton und 5 g Invertzucker enthielt, folgende Mengen Wasserstoff und Kohlensäure bildete:

4. Tag	10 ccm CO^2	11,6 ccm H	$\frac{H}{CO^2}$	$\frac{53,8}{46,2}$
13. „	32,7 „	11,2 „	$\frac{H}{CO^2}$	$\frac{25,5}{74,5}$
22. „	6,9 „	1,9 „	$\frac{H}{CO^2}$	$\frac{21,5}{78,5}$

In 20 ccm einer Nährlösung, welche 100 ccm mineralische Nährlösung, 0,25 g Pepton, 2,23 g Mannit enthielt, mit Kreide versetzt war und bei 35° gehalten wurde, bildete derselbe Bazillus (S. 397):

Tag	ccm CO^2	ccm H	$\frac{H}{CO^2}$
1.	6,1	11,3	$\frac{65}{35}$
8.	12,0	8,8	$\frac{42}{58}$
15.	21,5	15,0	$\frac{41,5}{48,5}$
20.	3,4	2,3	$\frac{40}{60}$

WINOGRADSKI (Centralbl. f. Bakt. 1902, II, IX, 109) zeigte, daß sein Clostridium Pastorianum in den drei angegebenen Nährlösungen CO^2 und H in folgenden Verhältnissen $\left(\frac{H}{CO^2}\right)$ erzeugte:

	1 % Dextrose 0,25 „ Pepton	1 % Dextrose 0,25 „ Asparagin	1 % Dextrose 0,25 „ Pepton
Anfang der Gärung:	$\frac{89}{11}$	$\frac{84,5}{15,5}$	$\frac{54,1}{46,1}$
Mitte:	$\frac{59,8}{40,2}$	$\frac{47,6}{52,4}$	$\frac{48,5}{51,8}$
Schluß:	$\frac{45,1}{54,9}$	$\frac{44,1}{55,9}$	$\frac{47,8}{52,5}$

PERDRIX's Bacille amylozyme, der seine Entwickelung einstellte, wenn er in 100 ccm der Kulturflüssigkeit 0,1 bis 0,12 g Säure (berechnet als SO^4H^2) gebildet hatte, erzeugte ein Gasgemisch, welches teilweise durch Ätzkali absorbiert werden konnte, zuletzt durch Verbrennung mit Bleichromat völlig in Wasser verwandelt wurde und danach kein anderes Gas als CO^2 und H^2 enthielt.

In Bouillon, welche mit Kalziumkarbonat und 1,95 % Dextrose versetzt worden war, entwickelte dieser Bazillus in Stickstoffatmosphäre

	H	CO^2	$\frac{H}{CO^2}$	CO^2 vom Kalziumkarbonat herrührend
36 Stunden nach der Impfung	1200 ccm	510 ccm	$\frac{70}{30}$	120 ccm
48 „ „ „ „	2640 „	1480 „	$\frac{64}{36}$	365 „
3 Tage „ „ „	3650 „	2410 „	$\frac{60}{40}$	625 „
9 „ „ „ „	5340 „	4080 „	$\frac{56}{44}$	1010 „

Ebenso, aber mit 4,88 % Sacharose

	H	CO^2	$\frac{H}{CO^2}$	CO^2 aus Kalziumkarbonat
3 Tage nach der Impfung	175 ccm	95 ccm	$\frac{65}{35}$	10 ccm
4 „ „ „ „	275 „	220 „	$\frac{55}{45}$	75 „
5 „ „ „ „	350 „	310 „	$\frac{53}{47}$	90 „
11 „ „ „ „	670 „	630 „	$\frac{52}{48}$	180 „

Der Bazillus FRIEDLÄNDER (FRANKLAND, STANLEY and FREW, ref. KOCH's Jahrb. 1891, S. 234) hatte nach einer Gärdauer von 11 Tagen erzeugt $\frac{47,41\,H}{51,14\,CO^2}$, nach 21 Tagen $\frac{43,24\,H}{56,57\,CO^2}$.

Uebung 16.

Untersuchung der von Bacillus asterosporus erzeugten Gase.

1. Voruntersuchung. Wir benutzen kleine Gärkölbchen mit Fuß (Christian Kob & Co., Stützerbach [Nr. 416 der Preisliste], Paul Altmann, Liste 1902, Abt. II, Nr. 630), die ungefähr 12 ccm fassen. Wir

waschen zwei Kölbchen gut mit Wasser aus, spülen sie mit ein paar Tropfen Spiritus aus, schließen sie mit einem vorher im Heißluftschranke sterilisierten Baumwollenbausche und stellen sie 30 Minuten in den Dampftopf. Hierauf füllen wir die Kugel eines jeden der aufrechtstehenden Gärkölbchen mit steriler Nährlösung I, biegen das Kölbchen zurück, sodaß die Flüssigkeit in den gebogenen Schenkel hineinfließt und ihn ganz erfüllt, schließen die Kölbchen mit dem Wattebausche und sterilisieren sie fünfzehn Minuten lang im Dampftopfe. Wir impfen mit einer Öse voll von Materiale, welches aus abgekochten Sporen von Bacillus asterosporus in 24 Stunden bei 18° erwachsen ist. Wir beobachten den Verlauf der Gasentwicklung und das Verhalten der Bakterien während der Gärung sowohl makroskopisch als mikroskopisch, solange wie Gasentwicklung stattfindet und notieren unseren Befund. Wir beachten den Geruch des Gases.

2. Quantitative Bestimmung der Bestandteile des Gases. Zur Durchführung dieser Uebung brauchen wir eine „Bakterien-Gasbürette" und einen kleinen Apparat zur Darstellung des Sauerstoffes, den wir von Dr. Siebert & Kühn in Kassel, Hohenzollernstrasse 4, herstellen lassen können, ferner einen kleinen Induktionsapparat und schließlich zwei Chromsäureelemente.

Ich beginne mit der Beschreibung der Gasbürette und bespreche dann deren Füllung, sowie die Gasgewinnung.

a. Die Bakterien-Gasbürette (nach Arthur Meyer). Die Bürette (Fig. 26) besteht aus einem u-förmig-gebogenen Glasrohre von 11,5 mm lichter Weite, welches ungefähr 55 ccm faßt und von einem Glasfuße G getragen wird. Der eine etwa 18 cm lange Schenkel des Rohres trägt oben einen schräg gebohrten Glashahn h mit 4 mm dickem, 3 cm langem, oberem Schenkel, einen gleichen aber in das Rohr hineinragenden Hahn H, dessen Röhrchen 4 mm dick, dessen vorderes Stück 2,5 cm lang ist, unten. Dieser Schenkel ist von oben ab in 14 ccm geteilt, mit Unterteilen von 0,2 ccm; über dem Hahne H befindet sich ein 3,5 cm langes ungeteiltes Stück; ganz oben sind dem Schenkel zwei Platindrähte E eingeschmolzen. Der andere etwa 23 cm lange Schenkel ist mit Teilstrichen versehen, die genau den Kubikzentimeter-Teilstrichen des ersten Schenkels gegenüberstehen, und ist unten in eine Kugel K erweitert. Etwas oberhalb der Kugel und gegenüber sind noch Niveaustriche für Quecksilber auf der Rückseite der Bürette angebracht. Bis zum oberen Ende der Kugel faßt die Röhre ungefähr 35 ccm, während der andere Teil des u-Rohres danach noch 20 ccm Inhalt besitzt.

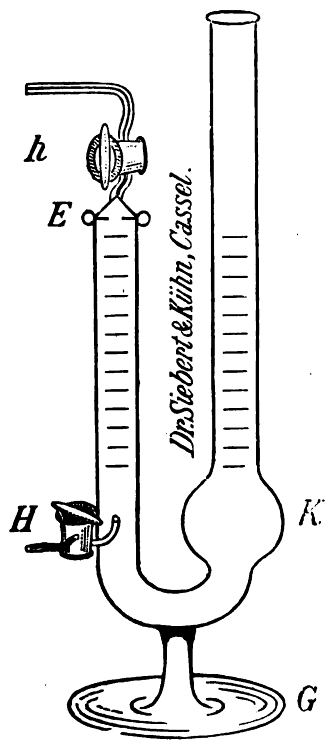


Fig. 26. Bakterien-Gasbürette nach Arthur Meyer.

Zum Herausnehmen von Flüssigkeit aus dem Rohre dient eine Pipette, welche aus einem 7 mm dicken, unten zur Spitze ausgezogenen Glasrohre, dem oben eine hohle Kautschukkugel aufgesetzt ist, besteht. Vor dem Gebrauche der Gasbürette sind die Hähne sorgfältig, aber nicht zu stark, mit einem Gemische aus zwei Teilen Talg und einem Teile Fett einzufetten, und dann ist die Dichtigkeit des oberen Hahnes zu untersuchen. Wir füllen die Bürette mit Wasser, lassen durch den oberen Hahn ungefähr 0,4 ccm Luft ein, schließen den Hahn und bringen dessen Rohr mit der Luftpumpe in Verbindung. Wenn der Hahn gut schließt, so darf kein Gas aus der Bürette austreten. Läßt sich Gas aussaugen, so muß die Bürette an den Fabrikanten zur Verbesserung zurückgesandt werden.

b. Die Gasentwicklung durch Bacillus asterosporus. Wir reinigen die Gasbürette, nachdem wir vorher das Fett von den Hähnen entfernt haben, mit Wasser, spülen sie innen sorgfältig mit wenig Spiritus durch, gießen den Spiritus aus, schließen die Bürette mit einem sterilen Baumwollenbausche und stellen sie 15 Minuten in den Dampftopf. Wir erhitzen das in einem Bechergläschen befindliche Talgfett, fetten die Hähne mit ganz wenig Fett ein, ohne die Bohrungen zu verstopfen, ziehen die Hähne durch die Flamme und setzen sie ein. Wir füllen die Bürette in folgender Weise mit der kurz vorher 20 Minuten im Dampftopfe erhitzten, dann wieder erkalteten Nährlösung I (1 Pepton, 1 Fleischextrakt, 1 Rohrzucker, 100 Wasser). Wir öffnen den oberen Hahn, füllen die Bürette ganz voll, so daß die Flüssigkeit durch den oberen Hahn ausläuft, schließen den oberen Hahn und lassen nun durch den unteren Hahn so viel Flüssigkeit auslaufen, daß das Niveau im langen Rohre bis zu der der 4 ccm-Marke gegenüberliegenden Marke sinkt.

Die Flüssigkeit impfen wir, wie in der Voruntersuchung, mit einer Öse voll der 24 Stunden alten Kultur von Bacillus asterosporus, stellen den Apparat bei 28° beiseite und schreiten zur Gasanalyse, wenn 5 ccm Gas gebildet worden sind.

Wir beginnen damit, das Volumen des Gases genau festzustellen und stellen zu dem Zwecke durch Ablassen von Flüssigkeit durch den unteren Hahn oder Eingießen von Wasser in den längeren Schenkel das Niveau der Flüssigkeit in beiden Schenkeln gleich. Danach setzen wir die Bürette in einen großen Glashafen, welcher mit Wasser gefüllt ist, dessen Temperatur wir genau auf 17,5° C. brachten, und lesen, wenn das Niveau der Flüssigkeit in dem kürzeren Schenkel konstant blieb, was nach 20 Minuten sicher erreicht sein wird, die Gasmenge ab, indem wir die Bürette auf den Tisch stellen, die Augen in gleiche Höhe mit dem Flüssigkeitsmeniskus bringen und den unteren Meniskus der Flüssigkeit als Marke benutzen.

In einem Beispiele betrug das Volumen (A) des Gases = 5,13 ccm.

c. Die Bestimmung der Kohlensäure. Wir entfernen mit der Pipette die Flüssigkeit aus der längeren Röhre bis zum oberen Kugelrande. Hierauf lösen wir in einem Bechergläschen 20 g Kaliumhydroxyd in 10 ccm Wasser, erwärmen die Lösung zum Sieden, kühlen sie ab und gießen sie in die Bürette. Wir bewegen die letztere vorsichtig, bringen die konzentrierte Kalilauge möglichst in den anderen Schenkel und mischen sie dann möglichst mit der Nährlösung, um alle Kohlensäure zu absorbieren. Danach stellen wir die Bürette 20 Minuten

in Wasser von 17,5°, bringen die Flüssigkeit in beiden Schenkeln (eventuell durch Zusatz von etwas Kalilauge 20 + 10) auf gleiches Niveau und lesen, wenn alles konstant bleibt, den Stand der Flüssigkeit in dem geschlossenen Schenkel ab. Das absorbierte Gas war Kohlensäure.

In dem Beispiele betrug das Volumen (A) des Gases jetzt 3,76 ccm, so daß Kohlensäure 1,37 ccm vorhanden gewesen waren. A — a = CO^2.

In dem noch vorhandenen Gase wollen wir nun weiter den Wasserstoff quantitativ bestimmen. Zu dem Zwecke stellen wir uns reinen Sauerstoff dar und setzen dann einen Induktionsapparat in Gang.

d. Darstellung des Sauerstoffs. Der Sauerstoffapparat (Fig. 27) besteht aus einer *u*-Röhre von 14 mm äußerer Weite, deren längerer, 33 cm langer Schenkel (*l*) oben zu einer Kugel (*K*) von ungefähr 110 ccm Inhalt, deren kürzerer Schenkel in einer Entfernung von 6 cm über der Biegung ebenfalls zu einer Kugel ungefähr von 80 ccm Inhalt aufgeblasen ist, die oben einen schräg gebohrten Hahn mit 4 mm dicker Röhre trägt. An zwei Stellen (— *p* und + *p*) sind Platinösen eingeschmolzen, welche mit einem 2,5 cm breiten, 4 cm langen, der Länge nach zu einer Spirale aufgerollten, dünnen Nickelbleche verbunden sind. Die Röhre ist in ein Brettchen eingelassen.

Man füllt den Apparat mit zehnprozentiger Kalilauge, indem man diese zum offenen Schenkel hinein gießt, nachdem man den Hahn, unter den man ein Porzellanschälchen hält, geöffnet hat. Läuft die Flüssigkeit aus dem Hahne aus, so schließt man denselben und gießt das Rohr bis unter die Kugel *K* voll.

Fig. 27. Sauerstoffapparat nach Arthur Meyer.

Zur Herstellung des Sauerstoffes verbindet man die Drahtöse (+ *p*), die zur Elektrode der unteren Kugel führt, mit dem Kohlepol (+ Pol) eines Chromsäureelementes, welches mit einem zweiten hintereinander (der Zinkpol des ersten mit dem Kohlepole des zweiten) durch einen starken Kupferdraht verbunden ist. Der Zinkpol des zweiten Elementes wird mit der anderen Öse (— *p*) verbunden. Es entwickelt sich der Sauerstoff an der Anode (+ *p*) und erfüllt die Kugel im Laufe von 5—8 Stunden: er ist fast ozonfrei und verliert die Ozonspuren im Lichte bald.

Zur Füllung der Chromsäureelemente (z. B. Flaschenelement 27 cm hoch; Desaga, Heidelberg; 11 Mk.) benutzt man folgende Lösung: 21 g Natriumbichromat in 100 ccm Wasser gelöst und 15 ccm Schwefelsäure nach und nach vorsichtig hinzugefügt.

e. Der Induktionsapparat. Wir benutzen einen kleinen Funkeninduktor von ungefähr 3000 Windungen (HUGERSHOFF), den wir durch eins der Chromsäureelemente in Bewegung setzen.

f. Bestimmung des Wasserstoffs. Haben wir in der Bürette 2,5 ccm Gas oder weniger, so können wir darin den Wasserstoff direkt bestimmen; ist mehr Gas in der Bürette, so müssen wir einen Teil desselben entfernen, da bei Anwendung einer größeren Menge von reinem Wasserstoff leicht ein Teil desselben bei der Explosion des Gasgemisches hinausgeschleudert wird.

Um die überschüssige Gasmenge hinauszulassen, füllen wir die Bürette zuerst mit einer Lösung von 20 g Kaliumhydroxyd in 10 g Wasser, die erhitzt und wieder erkaltet ist, voll und lassen dann durch vorsichtiges schnelles Oeffnen und Schließen des oberen Hahnes das Gas bis auf 2,6 bis 2 ccm austreten. Hierauf nehmen wir mit der Pipette oder durch den unteren Hahn so viel von der Flüssigkeit hinweg, daß die Niveaus in beiden Schenkeln gleich sind, stellen die Bürette 20 Minuten in Wasser von 17,5° C. und lesen den Stand des Gases in der Bürette genau ab.

In unserem Beispiele betrug die in der Bürette vorhandene Gasmenge (α) = 2,28 ccm.

Wir wollen nun eine zweckmäßig bemessene Menge Sauerstoff zu dem Gase bringen. Wir lassen zu dem Zwecke zuerst aus dem langen Rohre der Bürette durch den unteren Hahn so viel Flüssigkeit in ein Becherglas ablaufen, daß das Rohr nur bis zum oberen Kugelrande gefüllt bleibt und achten darauf, daß das Rohr des unteren Hahnes zuletzt ganz mit Flüssigkeit gefüllt bleibt. Hierauf führen wir auf je 1 ccm des Gases ungefähr 3 ccm Sauerstoff zu.

Wir verbinden den Hahn des Sauerstoffapparates mit dem unteren Hahne so durch ein kleines Kautschukröhrchen, daß beide Hähne dicht zusammenstoßen, öffnen den Hahn des Sauerstoffapparates und drücken das Röhrchen, soweit es auf der Röhre des Bürettenhahnes sitzt, etwas breit, damit ein wenig Sauerstoff ausströmen kann und der Schlauch ganz mit reinem Sauerstoffe gefüllt wird. Hierauf lassen wir den Schlauch los, öffnen den Bürettenhahn, bis die angegebene Menge des Sauerstoffs eingeströmt ist, schließen Gashahn und Bürettenhahn und trennen die Apparate.

Wir stellen hierauf die Flüssigkeit in beiden Schenkeln gleich hoch ein, setzen den Apparat 20 Minuten in ein Gefäß mit Wasser von 17,5° C., lesen den Stand der Flüssigkeit ab und notieren denselben.

In unserem Beispiele betrug jetzt das Gasvolumen (β) = 10,61 ccm. Danach war hinzugelassen ein Sauerstoffvolumen (o) = 8,33 ccm.

Jetzt füllen wir mit einem kleinen Trichterchen in den schräg gehaltenen offenen Schenkel der Bürette langsam, damit keine Luft mitgerissen wird, ungefähr so viel Quecksilber ein, daß es bei gleicher Einstellung auf beiden Seiten bis zu den ersten (hinteren) Marken über der Kugel reichen würde. Wenn wir das Quecksilber einfüllen, so steht anfangs das Niveau im langen Schenkel der Bürette höher als im kurzen. Wir stellen es durch Neigen des Apparates gleich, indem wir aus dem kurzen Schenkel Wasser in den langen übersteigen lassen. Es läßt sich dieses leicht bewerkstelligen, wenn wir die Bürette fast horizontal und denjenigen Schenkel fast horizontal, aber über den

anderen halten, in den das Wasser einfließen soll. Hierauf klemmen wir den geschlossenen Arm der Bürette in die Klemme eines eisernen Stativs ein, damit der Apparat bei der Explosion nicht umfallen kann und stellen eine größere Porzellanschale der Vorsicht halber unter. Wir verbinden die beiden Platinösen mit den Enden der äußeren Spirale des Induktionsapparates mittelst zweier dünner, übersponnener Kupferdrähte, bedecken die Bürette mit einem Tuche und setzen den Induktionsapparat in Gang. Ist die Explosion mit dumpfem Schlage erfolgt, so entfernen wir die Drähte, setzen die Bürette 20 Minuten in Wasser von 17,5° C., stellen dann zuerst durch richtiges Neigen der Bürette, Auslassen des Quecksilberüberschusses durch den unteren Hahn, oder Zusatz von etwas Quecksilber das Niveau des Quecksilbers auf die beiden unteren Marken ein, dann die wässerige Flüssigkeit ebenfalls gleich und lesen den Stand ab.

In unserem Beispiele waren jetzt 7,2 ccm Gas (r) vorhanden; der bei dem Verpuffen eingetretene Gasverlust (g) war demnach = 3,41 ccm. Berechnen wir für dieses Beispiel zuerst, wie viel dieser Verlust g Wasserstoff entsprechen würde, so finden wir $^2/_3\, g = 2{,}273$ ccm. Danach beständen die (a) = 2,28 ccm aus 2,273 ccm Wasserstoff, so daß wir annehmen müssen, es bestehe der ganze Gasrest, also auch die ursprünglich vorhandenen a-Volumen = 3,76 ccm aus Wasserstoff.

Danach stellt sich also das Resultat unserer Untersuchung folgendermaßen:

Anfängliches Gasvolumen	5,13 ccm	100 %
Kohlensäure	1,37 „	26,7 „
Wasserstoff	3,76 „	73,3 „ .

Bei einem anderen Versuche war:

$A = 4{,}37$ ccm		100 %
$a = 3{,}40$ „	$A - a = CO^2$ 0,97 ccm	22,2 „
$\alpha = 2{,}48$ „		
$\beta = 10{,}33$ „		
$r = 6{,}58$ „		
$g = 3{,}75$ „	$H = {}^2/_3\, g = 2{,}5$ „	77,8 „

In unserem Falle, in dem das durch Bacillus asterosporus entwickelte Gasgemenge aus CO^2 und H allein besteht, würde nach Absorption des noch in der Bürette vorhandenen O kein Gas mehr in der Bürette vorhanden sein. Da jedoch Fälle vorkommen, in denen auch noch N in den von den Bakterien erzeugten Gasen vorhanden ist, so wollen wir in unserer Bürette zur Uebung den noch vorhandenen Sauerstoff absorbieren lassen.

g) Absorption des Sauerstoffs. Wir nehmen die wässerige Flüssigkeit aus dem offenen Schenkel größtenteils weg, lösen in 5 ccm derselben 0,6 g Pyrogallol, gießen die Lösung in die Bürette, lassen sie in den geschlossenen Schenkel überfließen und mischen sie vorsichtig mit der dort befindlichen Flüssigkeit. Der Sauerstoff wird jetzt absorbiert. Die Absorption können wir durch Umschwenken der Flüssigkeit beschleunigen. Findet keine Absorption mehr statt, so stellt man die Bürette 20 Minuten in Wasser von 17,5° C., bringt dann Quecksilber und wässerige Flüssigkeit in beiden Schenkeln auf gleiches Niveau und liest ab.

In unserem Falle würde nun kein Gas mehr zurückbleiben dürfen. Wir finden jedoch, daß ungefähr 0,1 ccm Gas

unabsorbiert bleibt. Es ist dieses eine kleine Menge Kohlenoxydgas, welches sich durch Oxydation des Pyrogallols gebildet hat. Bei der Absorption von 1 ccm Sauerstoff bildet sich bei unserer Methode ungefähr 0,01 ccm CO, welches in Anrechnung zu bringen ist.

h. Analyse anderer Gasgemische. In den Gasgemischen, welche die Bakterien bilden, sind erfahrungsgemäß CO^2, H, N, CH^4 je allein vorhanden oder in verschiedener Weise gemischt. Behandeln wir ein solches Gas oder Gasgemisch nach unserer eben beschriebenen Methode, so können folgende Fälle eintreten:

1) Es wird das Gas von dem Kaliumhydroxyd völlig absorbiert. Dann ist nur CO^2 vorhanden.

2. Es bleibt ein Rest übrig nach der Behandlung des Gasgemisches mit Kalilauge. Derselbe kann alle übrigen Gase enthalten.

3. Wird dieser Rest mit Sauerstoff verpufft und wird dann der überschüssige Sauerstoff mit Pyrogallol absorbiert, so kann

a) das Gas ohne Rest verschwinden,

b) es kann ein Rest übrig bleiben. Dieser Rest ist dann Stickstoff, der direkt gemessen wird.

Im Falle a kann nun das Gas bestehen aus H oder CH^4 allein oder aus einem Gemische von beiden. So kann

4. nach der Verpuffung mit Sauerstoff der Fall eintreten, daß für 2 Vol. des anfangs vorhandenen Gases 3 Vol. Gas verschwunden sind. Dann ist das Gas Wasserstoff gewesen. Ist a das ursprüngliche Volumen des Gases, sind g Volumen der nach dem Verpuffen eingetretene Verlust, so ist das Volumen des vorhanden gewesenen

$$\text{Wasserstoff} = \frac{2}{3} g$$

und $\frac{2}{3} g$ muß $= a$ sein. Verbraucht wurden dann für 2 Vol. des Wasserstoffs 1 Vol. Sauerstoff.

5. Nach dem Verpuffen mit Sauerstoff können ferner für 1 Vol. des ursprünglich vorhandenen Gases 3 Vol. Gas verschwunden sein, dann ist das Gas reines Sumpfgas.

Ist a das ursprüngliche Volumen des Gases, sind g Volumen der nach dem Verpuffen eingetretene Verlust, so ist das Volumen des vorhanden gewesenen Gases

$$\text{Sumpfgas} = \frac{g}{3}.$$

Dabei würde für 1 Vol. Sumpfgas 2 Vol. Sauerstoff verbraucht worden sein.

5. Es kann dann der Fall eintreten, daß auf 2 Vol. des anfangs vorhandenen Gases eine zwischen 3 Vol. und 6 Vol. liegende Menge verschwunden ist. Dann liegt ein Gemenge von Sumpfgas und Wasserstoff vor. Kennt man die Menge des bei der Verpuffung über Kalilauge verschwundenen Gases $= g$, ferner die Menge des bei der Verpuffung verschwundenen Sauerstoffs, so läßt sich die Menge der beiden Gase berechnen.

Seien x die Wasserstoffvolumina,
y die Sumpfgasvolumina,
g der Gasverlust bei der Verpuffung,
s der Verbrauch an Sauerstoff.

so würden wir haben

$$x\left(\frac{3}{2}\right) + y(3) = g$$

$$x\left(\frac{1}{2}\right) + y(2) = s$$

$$y = s - \left(\frac{g}{3}\right)$$

$$x = \left(\frac{4g}{3}\right) - 2s$$

i. Ueberführen von Gas aus einer Bürette in eine andere. Um aus einer Gas enthaltenden Bürette *G* in eine andere Bürette *L* Gas überzuführen, verfährt man folgendermaßen:

Die Bürette *G* enthält in dem Rohre des oberen Hahnes Luft, welche zuerst entfernt und durch Wasser ersetzt werden muß. Zu dem Zwecke setzt man an das Rohr des Hahnes ein ungefähr 6 cm langes Stück eines dünnen, dickwandigen Schlauches an, den man mit dem Schlauche der Luftpumpe mittelst eines Glasröhrchens verbindet. Man setzt hierauf die Pumpe in Gang und läßt den Schlauch völlig evakuieren. Hierauf taucht man den kurzen Gummischlauch völlig in eine Schale mit Wasser ein und entfernt, während die Pumpe arbeitet, das verbindende Glasröhrchen. Es strömt jetzt das Wasser ein und erfüllt auch das Röhrchen des Glashahnes. Nun gießt man Quecksilber in den längeren Schenkel ein, so daß es in ihm mindestens um doppelt so viel Kubikzentimeter-Marken höher steht, als Gas ausgetrieben werden soll.

Die Bürette *L* wird mit ausgekochtem Wasser völlig gefüllt, so daß auch das Rohr des oberen Hahnes voll Wasser steht, dann wird das Wasser im offenen Schenkel bis zum oberen Kugelende entfernt.

Hierauf verbindet man die oberen Hähne der Büretten *G* und *L* mittelst eines Gummischlauches, der mit Wasser gefüllt ist, so, daß die Hähne dicht zusammenstoßen, öffnet erst den Hahn der Bürette *G*, dann vorsichtig den der Bürette *L* und läßt das Gas in die Bürette *L* hineindrücken.

Kapitel XVII.

Färbung fixierter Bakterien.

Litteratur.

Grimme, *Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle; Dissertation, Marburg 1902.* — ***Abel***, *Taschenbuch für den bakteriol. Praktikanten; 5. Aufl., 1900.*

A. Intensivfärbung der fixierten Bakterien.

Die Färbung angetrockneten und dann fixierten Bakterienmaterials spielt in der Bakteriologie eine große Rolle, da diese es häufig mit dem Nachweise von Bakterien in Substraten zu thun hat, welche die Auffindung der Bakterien erschweren. Man benutzt dabei Färbemethoden, welche eine starke Färbung der Bakterien und keine der mit ihnen gemischten Substanzen bewirken. Für unsere Zwecke sind

diese Methoden weniger wichtig und kurz zu behandeln, nur die Carbolfuchsin-Schwefelsäure-Methode und die GRAM'sche Methode können zur Aufstellung von Speziesmerkmalen dienen und sind deshalb eingehender zu betrachten.

Die Fixierung. Will man ein „fixiertes“ Präparat herstellen, so verfährt man folgendermaßen. Man streicht auf ein gut gereinigtes Deckglas ganz wenig des Materials möglichst dünn aus, läßt antrocknen und fixiert folgendermaßen: Man faßt das Deckglas an einer Ecke mit der Cornetpincette (Fig. 28) und bewegt das Präparat, die bestrichene Seite nach oben, dreimal langsam durch die Flamme eines Bunsenbrenners, so langsam, als man gerade noch einen Finger durch die Flamme bewegen kann, ohne Schmerz zu empfinden. Dadurch sterben die Bakterien ab und haften fester am Deckglase als beim bloßen Antrocknen.

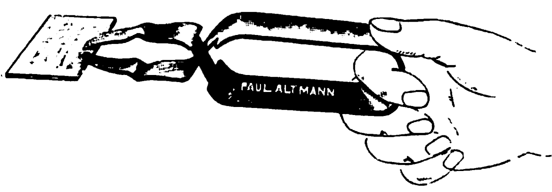


Fig. 28. Cornet'sche Pincette.

Die Intensivfärbung. Zur Intensivfärbung bringt man mit einer kleinen Pipette oder mit einem Glasstabe so viel Farblösung auf das mit der Pincette gehaltene Deckglas auf, als es fassen kann und läßt die Farblösung einige Minuten (gewöhnlich 5 Minuten) darauf stehen, oder man erwärmt kürzere Zeit (10—60 Sekunden) hoch über der Bunsenflamme, so dass die Farblösung zu dampfen beginnt.

Das Abspülen. Bei einfachen Färbungen wird das Präparat hierauf nur mit Wasser abgespült.

Für alle solche Spülungen gebrauchen wir zweckmäßigerweise folgende kleine Vorrichtung. Eine Flasche von 5 Liter Inhalt, mit unterem, seitlichem Tubus wird hoch (auf einem Schranke etc.) aufgestellt. Der Tubus ist mit einem durchbohrten Korke geschlossen; durch ihn führt ein Glasröhrchen mit daran befestigtem, 2 Meter langem Gummischlauche, der unten mit einem spitz ausgezogenen Glasröhrchen versehen, hinter dem der Gummischlauch mit einem sich durch Druck öffnenden Quetschhahn geschlossen ist. Das Glasröhrchen wird in die Klemme eines kleinen Stativchens (Fig. 29) eingeklemmt. Die Glasflasche wird mit Wasser gefüllt und liefert einen feinen Wasserstrahl von konstantem Drucke. Unter den Ausfluß des Röhrchens wird eine große Glasschale gestellt. Man reinigt das Deckglas mit Fließpapier auf der un bedeckten Seite und läßt es dann trocken werden.

Beobachten. Man legt das Deckglas in einen Tropfen Wasser oder in ein Tröpfchen Xylol oder Kanadabalsam und beobachtet mit der Immersion.

Uebung 17.

Färben mit Fuchsinlösung 1 + 10.

Wir benutzen frisch bereitete Fuchsinlösung 1 + 10 und färben 27—28 Stunden altes Material von Bacillus tumescens, welches eben mit der Sporenbildung begonnen hat. Wir färben fixiertes Material 5 Minuten kalt oder 10—60 Sekunden erwärmt und beobachten das

gespülte Präparat in Wasser. Wir finden in 10 Sekunden lang warm gefärbten Präparaten das Zytoplasma der Sporangien rot, die Sporenanlagen tief rot, die Fetttropfen farblos, die fertigen Sporen farblos (Fig. 30 u. 32 der Tafel). Färben wir 60 Sekunden warm, so sind die Differenzen geschwunden, selbst die fertigen Sporen färben sich schon etwas mit, ebenso die Fetttropfen (Fig. 33). Bei Ruhestäbchen findet man häufig das Zytoplasma von der dunkel gefärbten Membran zurückgezogen (Fig. 34 u. 35); an manchen Stäbchen sieht man eine feine Kontur, die Grenze der Schleimschicht (Fig. 36 der Tafel). Wir legen ein paar der 60 Sekunden warm gefärbten Präparate in Kanadabalsam und beobachten. Wir sehen, daß jetzt die Stäbchen kleiner geworden sind; ihre Dicke verhält sich zu der der in Wasser liegenden ungefähr wie 2:3. Die Farbe ist braunrot, die Umrandung der Zellen ist höckerig geworden (Fig. 37). Man sieht also im allgemeinen an den in Kanadabalsam liegenden Präparaten weniger als an den in Wasser liegenden. Aehnlich wie die Färbung mit Fuchsin, würde die Färbung mit Methylenblau 1 + 10 wirken, intensiver und die Details zerstörender die mit Karbolfuchsin und Anilinwasser-Methylviolett.

B. Die Säurefestigkeit.

Ehrlich fand (1882), daß die Tuberkelbakterien nach Intensivfärbungen durch verdünnte Säuren nicht entfärbt wurden, daß sie „säurefest“ sind. In den letzten Jahren sind eine Reihe anderer Bakterienspezies gefunden worden, welche sich gleich verhalten, z. B. der Timotheebazillus Möllers (1898). Grimme zeigte, daß verschiedene Morphoden einer Spezies verschieden säurefest sein können.

Wir benutzen folgende Methode der Färbung: In einem kleinen, 6 cm breiten, flachen Porzellanschälchen wird Karbolfuchsin über der sehr kleinen Bunsenflamme langsam erwärmt; auf die Oberfläche der Farblösung wird das fixierte Deckglas mit der Objektseite aufgelegt; die Flüssigkeit wird bis zum leichten Aufkochen erhitzt, dann die Flamme hinweggenommen und das Präparat noch 2—3 Minuten auf der Farblösung liegen gelassen. Das Deckglas wird mit einer Pincette abgehoben, 15 Sekunden in ein fünfprozentige Schwefelsäure enthaltendes Becherglas, dann 30 Sekunden in 70-prozentigen Alkohol eingetaucht, zuletzt mit Wasser abgespült und in Wasser untersucht.

Die Säurefestigkeit hat ihre Ursache wahrscheinlich in dem Vorhandensein eines Stoffes im Zytoplasma, der kein Fett und kein Eiweißstoff ist, sich in 80-prozentigem Alkohol, in Aether und in $^1/_2$-prozentiger Salzsäure löst und durch Eau de Javelle zerstört wird.

Uebung 18.

Uebung der Säurefestigkeitsmethode.

Wir färben fixiertes Material von Bacillus tumescens nach der Säurefestigkeitsmethode und zwar:

1. Altes Sporenmaterial; die meisten Sporen bleiben rot gefärbt, nur die Intine ist farblos (Fig. 38 der Tafel); gequollene Sporen färben sich schwächer.

2. Sechs Stunden alte Keimstäbchen; junge Keimstäbchen bleiben rot gefärbt (Fig. 39) und zeigen Vakuolen (Keimstäbchen von Bacillus cohaerens entfärben sich).

3. 25 bis 30 Stunden altes Sporangienmaterial; Membran und Zytoplasma werden farblos, die Sporenanlagen und jungen Sporen bleiben rot (Fig. 40).

In gleicher Weise könnte man Sputum Schwindsüchtiger behandeln, um die Tuberkelbakterien darin nachzuweisen.

C. Die GRAM'sche Färbung.

Die GRAM'sche Färbung dient in der Bakteriologie zwei Zwecken. Einmal wird sie verwendet zur Nachweisung von Bakterien in Gewebeschnitten und anderen Substraten, da bei der Alkoholbehandlung, welche wir sogleich bei Beschreibung der Methoden kennen lernen werden, in vielen Fällen die Bakterien noch intensiv gefärbt bleiben, wenn alle übrigen Dinge im Präparat entfärbt sind. Für eine derartige Verwendung darf man statt des Alkohols auch dreiprozentigen Salzsäurealkohol benutzen. Zweitens benutzt man die Resultate der Gramfärbung auch als Spezieskennzeichen, da es sich herausstellte, daß manche Bakterienspezies sich leicht, manche sich schwierig bei der Alkoholbehandlung entfärben. Diese zweite Anwendung interessiert uns. Zugleich ist die Methode recht brauchbar zur Sporenfärbung; Exine und Intine werden oft gut differenziert, und charakteristische Eigenschaften der Sporenmembran treten oft scharf hervor.

Wir verwenden als Farblösung „Gramviolett“ und „Gramjodlösung“ (siehe unter Reagentien).

Zur Ausführung der Färbung bringt man, nach Präparation und Fixierung des Objektes, das Gramviolett auf die Objektseite des mit der Cornetpincette an der Ecke gefaßten Deckglases und erwärmt zwei Minuten über der Bunsenflamme bis zur schwachen Dampfentwickelung. Man gießt die Farblösung ab, hängt die Cornetpincette an einen horizontal in die Klemme eines Statives eingeklemmten Glasstab und taucht das Deckglas in ein Bechergläschen mit frischer Gramjodlösung. In der Jodlösung verbleibt das Präparat zwei Minuten. In der gleichen Weise hängt man das Präparat hierauf zehn Minuten in ein Becherglas mit absolutem Alkohol, spült zuletzt mit Wasser ab und untersucht das Präparat in Wasser.

Uebung 19.

Ausführung der Gramfärbung.

Wir färben nach dieser Methode:

1. alte Sporen; Exine dunkel, Intine farblos, Stäbchen dunkel (Fig. 41);

2. sechs Stunden alte Keimstäbchen; Färbung gleichmäßig dunkel, eventuell auch Exine der Sporenhaut dunkel (Fig. 42);

3. 27 bis 28 Stunden altes Sporangienmaterial; Protoplasten hellviolett, Fetttropfen fast farblos, Sporenanlagen dunkel (Fig. 43).

Der Farbstoff wird im allgemeinen zuerst vom Zytoplasma festgehalten. Glykogen und Fett färben sich nicht, ebensowenig die Schleimschicht der Membran und die Membran fixierter Objekte. Am festesten hält das Sporenplasma den Farbstoff, dann folgt das Plasma der Sporenanlage, das Zytoplasma der Keimstäbchen, das Zytoplasma der Ruhestäbchen, und am wenigsten fest hält das Zytoplasma der Sporangien den Farbstoff.

Kapitel XVIII.

Die Geißelfärbung.

Litteratur.

Allgemeines. ***Ellis,*** *Beiträge z. Kenntnis der Coccaceen u. Spirillaceen (Centralbl. f. Bakt. I. Abt., 1902—1903, Bd. XXXIII, Originale); Marburger Dissertation 1903.* — ***Alfred Fischer,*** *Ueber die Geisseln einiger Flagellaten; Pringsh. Jahrb. f. wiss. Botanik, 1894, S. 187.* — ***Alfred Fischer,*** *Untersuchungen über Bakterien; Pringsh. Jahrb. f. wiss. Botanik, 1895, S. 1.* — ***Arthur Meyer,*** *Ueber Geisseln, Reservestoffe, Kern- und Sporenbildung der Bakterien; Flora 1899.* — ***Migula,*** *1897, Bd. I.* — ***Schaudinn,*** *Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen, I. Bacillus bütschlii n. sp.; Archiv f. Protistenkunde 1902, S. 306.* Geißelfärbung. ***Behrend,*** *Nachprüfung zweier neuer Methoden der Geisselfärbung bei Bakterien; Dissertation, Königsberg 1902 (Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1902, Bd. XXXII).* — ***Mac Conkey,*** *The Thompson Yates Laborat.; Report., Liverpool 1901 (siehe Gemelli 1903).* — ***van Ermengem,*** *Nouvelle Méthode de Coloration des Cils des Bactéries; Travaux du Laboratoire d'Hygiène et de Bactériologie de l'Univ. de Gand, 1893, T. I, Fasc. 3. (Ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. XV, S. 969.* — ***Gemelli,*** *Eine neue Färbemethode der Bakteriengeisseln; Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1903, Bd. XXXIII, No. 4, Originale.* — ***Hinterberger,*** *Eine Modifikation des Geisselfärbungsverfahrens nach van Ermengem; Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1900, Bd. XXVII, S. 597.* — ***Koch,*** *Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien; Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877, Bd. II, H. 3.* — ***Kuntze,*** *Einige Bemerkungen über die Färbung der Geisseln, besonders über das Verfahren von van Ermengem; Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1902, Bd. XXXII, No. 7, S. 555, Originale.* — ***Löffler,*** *Weitere Untersuchung über die Beizung und Färbung von Geisseln bei den Bakterien; Centralbl. f. Bakt. 1890, Bd. VII, S. 625.* — ***Löffler,*** *Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen, insbesondere ihrer Wimperhaare und Geisseln; Centralbl. f. Bakt. 1889, Bd. VI, S. 209.* — ***Neuhaus,*** *Ueber die Geisseln an den Bazillen der asiatischen Cholera; Centralbl. f. Bakt. 1889, Bd. V, S. 81.* — ***Nicolle et Morat,*** *Technique de la coloration des cils; Annales de l'Institut Pasteur, 1893, p. 554.* — ***Peppler,*** *Ein einfaches Verfahren zur Darstellung der Geisseln; Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1901, Bd. XXIX, No. 8, S. 345.* — ***De Rossi,*** *Di un metodo semplice per colorare le ciglia dei batterii; Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1901, Bd. XXIX, S. 364.* — ***Smith,*** *Publications Cornell University Medical College 1901 (siehe Gemelli 1901).* — ***Welcke,*** *Eine neue Methode der Geisselfärbung; Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. XXVI, No. 16/17, S. 520.* — ***Zettnow,*** *Ueber Geisselfärbung bei Bakterien; Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten, herausgegeben von Koch und Flügge, 1899, S. 95.*

A. Allgemeines über die Geißeln der Bakterien.

Geißeln besitzen alle Bakterien, welche Eigenbewegung zeigen (nur Beggiatoa nicht). Ob es Bakterienspezies gibt, denen Geißeln völlig fehlen, ist durch die Untersuchung von Ellis (1903, S. 39) mindestens zweifelhaft geworden. Vielleicht haben jedoch die Gattungen Migulas Spirosoma und Bacterium noch Berechtigung. Manche Spezies behalten unter Umständen in allen Entwickelungsstadien, mit Ausnahme des Endosporenzustandes, die Geißeln. Bei zahlreichen Spezies scheinen im normalen Entwickelungsgange begeißelte Individuen mit geißellosen abzuwechseln. So z. B. soll Bacillus subtilis mit geißellosen Stäbchen keimen, die sich vermehren, schließlich Geißeln bilden und durch Teilung sich weiter reichlich vermehrende Schwärmer liefern, welche ihre Geißeln später abwerfen und wieder zahlreiche geißellose Nachkommen entwickeln, in denen die Sporen als letzte geißellose Morphode entstehen.

Alle bisher beobachteten Zilien der Bakterien sind einfach fadenförmig, äußerst zart, bei den verschiedenen Spezies aber durchaus nicht gleich dick. Sie können 5- bis 50mal so lang wie der Querdurchmesser der Bakterienzelle werden. Fixiert und färbt man die Geißeln, so erscheinen sie meist gekrümmt und zwar (nach Migula) bei den Pseudomonasarten meist regelmässig, bei Bacillus und Mikrospira (Migula,

S. 116) etwas weniger regelmäßig wellig; dagegen sind bei Spirillum die relativ kurzen Geißeln meist einfach oder zweifach bogig gekrümmt.

Wie alle anderen Zilien hat man die Bakterienzilien als alloplasmatische Organe aufzufassen, und es ist sehr wahrscheinlich, daß sie, wie alle anderen, darauf hin genau untersuchten Zilien, direkt mit dem Zytoplasma des Protoplasten zusammenhängen, also die Membran der Bakterien durchsetzen. Wenn MIGULA S. 117, S. 127 und S. 57 meint, die Zilien der Bakterien gingen von der Membran aus, so ist das so lange als falsch zurückzuweisen, bis direkte Beweise für diese Meinung vorliegen.

Ebenso verhält es sich mit SCHAUDINN's (1902, S. 315) gleichsinniger Angabe; die Abbildung, die er von dem begeißelten Bazillus gibt, zeigt auch, daß das Geißelpräparat für diese Anschauung keinen Anhaltspunkt liefern konnte. Ich habe MIGULA's und SCHAUDINN's Behauptungen schon früher (1899, S. 130) zurückgewiesen, und die Beobachtungen von ELLIS (1903, S. 31) lassen wenigstens darüber kaum einen Zweifel, daß die Geißeln bei Spirillum mit dem Zytoplasma zusammenhängen.

Zahl und Insertion der Geißeln können verschieden sein. Eine oder mehrere Geißeln können erstens am einzelligen Inviduum polar inseriert sein, dabei je nach dem Entwickelungsstadium entweder an einem Pole oder an zwei Polen sitzen. Zweitens können die Geißeln über den ganzen Körper der Individuen zerstreut sein. MESSEA (Ref. C. f. B. 1891, S. 107) hat zuerst eine systematische Klassifikation der Bakterien auf Grundlage der Begeißelung gegeben und schlägt vor zu unterscheiden:

I. Gymnobacteria.

II. Trichobacteria
- 1. Monotricha (eingeißelig)
- 2. Lophotricha (büschelgeißelig)
- 3. Amphitricha (beiderseitig- „)
- 4. Peritricha (allseitig- „)

Monotricha sind nach ihm die, welche eine Geißel an einem Pole haben; die Lophotricha tragen ein Büschel von Geißeln an einem Pole; die Amphitricha haben an jedem Pole eine Zilie; die Peritricha sind rings von Geißeln umgeben. Da es Spezies, die in allen Individuen nur einen oder nur beide Pole mit Geißeln besetzt haben, nicht gibt, so ist die 1., 2. und 3. Gruppe systematisch unmöglich. Deshalb kann man auch nicht mit Messea gut von monotrichen, lophotrichen und amphitrichen Spezies reden, wohl aber von monotrichen Individuen.

Will man, abweichend von MESSEA's ursprünglicher Definition, monotrich (eingeißelig) für Spezies mit einer Geißel, lophotrich (büschelgeißelig) für Spezies mit Geißelbüschel an einem oder an beiden Polen benutzen, so ist dann natürlich nichts entgegenzuhalten. Wir wollen die Ausdrücke eventuell in diesem Sinne gebrauchen.

Von der Thätigkeit der Geißeln hängt die Bewegung der Schwärmer allein ab. Für das Verständnis der Bewegung der einpolig-monotrichen oder einpolig-lophotrichen Individuen kommt die Frage in Betracht, ob die Geißeln am Vorderpole oder Hinterpole der Bewegung stehen. Ich möchte mit FISCHER (S. 16 d. Vorlesungen) vermuten, daß sie vorn stehen. Ueber die Form der Bewegung der Einzelgeißeln macht MIGULA (1897, S. 111) eine Angabe. Es pflanzt sich nach ihm bei Spirillum volutans von der Spitze der Geißel „eine deutlich schraubenförmige Bewegung nach der Basis zu fort“, nie eine wellenförmige, sie „verläuft

stets in Schraubenwindungen.“ Bei peritrichen Schwärmern glaubt MIGULA eine wellenförmige Bewegung annehmen zu müssen; beobachten konnte er die Bewegung dieser zarten Gebilde nicht. Die durch die Geißelbewegung verursachte Schwimmbewegung der Individuen ist zuerst eine, schon je nach Spezies, verschieden schnelle; im Mittel werden von den Schwärmern in der Stunde etwa 40 cm zurückgelegt. Bei dieser Vorwärtsbewegung rotieren alle Schraubenbakterien fortwährend um eine Längsachse, die geraden Stäbchen und kugeligen Formen wohl die meiste Zeit. Ein Punkt der Achse der geraden Stäbchen würde also bei der ruhigen Vorwärtsbewegung der Stäbchen allermeist eine Schraubenlinie beschreiben.

Bei peritrichen Stäbchen beobachtet man nicht selten auch ein Wackeln, welches z. B. bei Bacillus asterosporus ungefähr in der Horizontalebene, nach rechts und links, mit einem etwa in der Mitte der Länge liegenden Drehpunkte stattfindet. Statt dessen kann sich das Stäbchen auch so bewegen, daß das Vorder- und Hinterende einen Kreis beschreibt, während ein ungefähr in der Mitte der Länge des Stäbchens liegender Punkt relativ in Ruhe ist. Ob bei diesen letzteren Bewegungen zugleich Rotation des Stäbchens um seine Längsachse stattfindet, ist nicht bekannt. Eigenartig sind bei peritrichen Bakterien auch die Purzelbewegungen (FISCHER, Vorl., S. 16). Die Zelle eilt dann, sich fortwährend um die Querachse überschlagend, durch das Gesichtsfeld. Die peritrichen Stäbchen können, wie ich bei Bacillus asterosporus sah, mit der Vorwärts- und Rückwärtsbewegung wechseln, ohne sich zu drehen, wie eine Lokomotive auf geradem Geleise. Die Intensität der Bewegung der einzelnen Individuen ist von äußeren Verhältnissen sehr abhängig. Ungünstige Temperaturen, wasserentziehende Mittel, Gifte, Säuren im Uebermaße, Nährstoffmangel, Sauerstoffmangel etc. können die Bewegung der Geißeln völlig zum Stillstande bringen. (Siehe über Geißelstarre FISCHER, 1894, S. 75).

Die Entwicklungsgeschichte der Geißeln ist wenig untersucht. Man hat die Entwicklung der Geißeln an den geißelfreien Keimstäbchen und die Entwicklung neuer Geißeln bei der Teilung von Schwärmern auseinander zu halten. FISCHER (1895, S. 103) hat die Entwicklung der Geißeln an den Keimstäbchen von Bac. subtilis untersucht, aber wenig Sicheres darüber mitgeteilt. Der peritriche Spaltpilz keimt mit zilienlosen Stäbchen, welche sich 6—7 Stunden durch Teilung vermehren. Dann erscheinen erst an den Stäbchen Geißeln. FISCHER konnte einmal unter den gefärbten Präparaten einer 18 Stunden alten Kultur, „die alle Stadien der Entwicklung darbot“, Schwärmer mit relativ kurzen Geißeln (Fig. 7), die er für Jugendstadien der Geißeln erklärt, beobachten. Schwärmer, die er aus 7-Stundenkulturen färbte, zeigten sehr zarte Geißeln, solche aus 22 Stunden alten Kulturen zeigten viel dickere Geißeln, was FISCHER auf die größere Quellungsfähigkeit älterer Geißeln zurückführt, nicht auf ein Dickenwachstum derselben. Aus meinen eigenen Untersuchungen (1899, S. 429) gewann ich den Eindruck, als bildeten die ersten Nachkömmlinge der aus den Sporen auskriechenden Oidien relativ dünne und kurze, spätere Teilprodukte dickere und längere Geißeln.

Ueber die Geißelbildung während der Teilung der Keimstäbchen sagt FISCHER folgendes:

„Wenn Bazillen mit diffusen Geißeln sich weiterhin durch Teilung vermehren, so muß natürlich der dichte Geißelbesatz, der früher ein

kurzes Stäbchen bedeckte, nach dessen Streckung sich auf eine größere Oberfläche verteilen. Die Geißeln müssten folglich lockerer stehen, um so größere Zwischenräume zwischen sich lassen, je öfterer Teilung erfolgt wären. Davon ist aber nichts zu sehen, Ketten von drei, vier und noch mehr Gliedern, die sicher alle Abkömmlinge eines einzigen Stäbchens sind, tragen auf ihrer ganzen Oberfläche denselben dichten Geißelbesatz, wie Einzelstäbchen. Es bleibt nur die Annahme übrig, daß während der ganzen Streckung der Bazillen zwischen den fertigen Geißeln neue gebildet werden, die die Lücke wieder ergänzen. Es ist nicht gelungen, in den Präparaten solche Entwickelungszustände aufzufinden, weder bei Bacillus subtilis, noch beim Typhusbazillus und dem typhusähnlichen Wasserbazillus."

Genauere Angaben macht FISCHER über die Entstehung der Geißeln von Spirillum undula bei der Teilung der Individuen.

Spirillum undula trägt an einem eben geteilten, nach dem Antrocknen halbkreisförmig erscheinenden Individuum normalerweise nur an einem Pole ein Geißelbüschel. Während das Individuum heranwächst, einen zweiten Bogen bildend, und sich zur Teilung anschickt, wächst am anderen Ende ein Geißelbüschel hervor; dann tritt bald Trennung der beiden durch Wachstum und Teilung neu entstandenen Individuen ein. Trennen sich einmal die durch Teilung entstandenen bogenförmigen Individuen nicht bald voneinander, so können nach FISCHER an den Keimungsstellen seitlich Geißelbüschel hervorwachsen, während ELLIS (1903) solche seitlich sitzenden Büschel niemals sehen konnte, so daß es wahrscheinlich ist, daß FISCHER sich getäuscht hat.

Bei denjenigen Spezies, welche nach der Schwärmoidienform, als Nachkommen der letzteren, Ruhestäbchen ausbilden, gehen die Geißeln der Schwärmer beim Übergange in den Ruhezustand anscheinend verloren. Wie dieser Verlust eintritt, ist meines Wissens nicht untersucht.

Die Geißeln der lebenden Bakterien sind relativ leicht zersetzbare Gebilde. Wie Euglena und andere Flagellaten werfen viele Bakterien (vielleicht besonders leicht diejenigen, welche auch Ruhestäbchen in ihrem Entwicklungsgange ausbilden) ihre Geißeln leicht ab, wenn Schädlichkeiten auf sie einwirken, wenn vielleicht nur irgend ein schroffer Wechsel äußerer Verhältnisse eintritt. Dabei können die Zilien gerade oder gewellt, vorher abgeworfen oder am Körper sitzend verquellen und zu Grunde gehen, oder sie können vorher sich ringförmig einrollen (FISCHER, 1894, S. 93), wie manche Pilzsporengeißeln. Die Auflösung der lebenden Geißel erfolgt stets unter Quellung, welche die Geißel anfangs mehr und mehr dicker, dabei weniger dicht erscheinen läßt, während eine Verlängerung der Geißel kaum eintritt.

Sterben die Bakterien in den Kulturen langsam ab, so können die Geißeln an den toten Bakterien oft lange erhalten bleiben; sie verquellen, wenn sie der Tod im intakten Zustande erreicht hat, nicht mehr (FISCHER, S. 94), wie das ja eine allgemeine Eigenschaft der plasmatischen und alloplasmatischen Organe ist. Da sich nach FISCHER (S. 121) die Geißelzöpfe in 0,5prozentiger Chromsäure gut erhalten, so wäre ein Fixieren der Bakteriengeißeln mit dieser Lösung vielleicht möglich.

B. Allgemeines über Geißelfärbung.

KOCH (1877) färbte zuerst Geißeln mit Kampecheholzextrakt und Chromsäurelösung, NEUHAUS (1889) mit Kaisertinte und chromsaurem

Natron (S. 83). Ein allgemein brauchbare Methode fand LÖFFLER, als er zufällig nach der Färbung von Schleimmembranen der Bakterien mit Tinte noch versuchte, auch die Bakterienleiber desselben Präparates mit Methylenblau zu färben, sah, daß die Tinte als Beize wirkte, und nun das Experiment machte, die Geißeln, denen er eine gleiche Natur wie den Kapseln zuschrieb, ebenfalls mit Tinte zu beizen und mit intensiv färbenden Farbstofflösungen nachzufärben. Er versuchte als Beizen Tannin, Galläpfelabkochung, Kampecheholzabkochung, Querzitron, keine dieser Substanzen wirkte so gut wie Gallustinte (1889, S. 212), ebensowenig beizten Tannin und Ferrosulfat, noch weniger Tannin und Ferrisulfat, so gut wie Gallustinte. Er versuchte dann allerhand Zusätze, die bei der Tintenfabrikation mit benutzt werden, und kam so schließlich auf eine Beize, welche aus Tannin, Ferrosulfat, Kampecheholzabkochung und einer Färbelösung, welche Anilin, etwas Natriumhydroxyd, Methylviolett, Methylenblau oder am besten Fuchsin, in Wasser gelöst, enthält. Angaben über die Versuche mit Sublimat, Platinchlorid, alkalischem Chromchlorid als Beize finden sich S. 221 der Abhandlung, solche über Versuche mit Ferrisulfat etc. S. 222.

1890 publizierte LÖFFLER eine Abhandlung, in welcher er angab, daß die Reaktion der Beize von Bedeutung, und daß je nach Spezies saure oder alkalische Beize anzuwenden sei. Zugleich empfahl er die von uns nachher angewandte Fuchsintinte und betonte die folgenden, zur Erreichung guter Färbungen wichtigen Momente.

Besonders wichtig für gute Färbung (LÖFFLER 1890, S. 633) ist 1. das Reinigen der Deckgläser. Er läßt mit konzentrierter Schwefelsäure erwärmen, mit Wasser waschen, in Alkoholammoniak legen und mit fettfreiem Tuche putzen. 2. Zu starke Erhitzung beim Fixieren schädigt die Färbbarkeit der Geißeln; man halte deshalb das zu fixierende Deckglas mit den Fingern. 3. Die Beize soll $^1/_2$—1 Minute unter Erwärmen bis zur Dampfbildung auf dem Deckgläschen bleiben. 4. Die Beize soll mit einem starken Wasserstrahl, dann mit absolutem Alkohol entfernt werden. 5. Die Farbstofflösung soll auf dem Deckglase 1 Minute, unter Erwärmen bis zur Dampfbildung, einwirken. Gefärbt soll werden mit einer Lösung von festem Fuchsin in gesättigtem Anilinwasser, dem man so viel einer 1 % Natronlauge zusetzt, bis die Lösung beginnt undurchsichtig zu werden; dann färbt sie am intensivsten. 6. Es soll das Material von frischen Kulturen (5—8 Stunden alt) angewandt (S. 653) werden, welches event. nicht mit destilliertem Wasser (welches das Bewegungsvermögen mancher Bakterien schädigt), sondern mit Brunnenwasser verdünnt werden soll.

Von den Veränderungen, die für die LÖFFLER'sche Methode vorgeschlagen worden sind, seien die folgenden erwähnt. NICOLLE et MORAX (1893) fanden, daß Alkali- oder Säurezusatz unnötig sei, fixierten die angetrockneten Bakterien nicht durch Erwärmen, beizten nochmals, ließen den Alkohol als Waschmittel weg und färbten mit Ziel'scher Lösung (100 Wasser, 5 Karbolsäure, 10 Alk., 1 Fuchsin).

TRENKMANN (C. f. B. 1889, S. 433) hatte gleichzeitig mit LÖFFLER gearbeitet. Er beizte 2—12 Stunden mit einer Lösung von 1 Tannin und 0,5 Salzsäure in 100 Wasser, spülte ab und färbte 1—4 Stunden in dünner wässeriger Fuchsinlösung etc.

SACHAROFF (Annales de l'Inst. Pasteur 1893, p. 550) wandte nur Eisensulfat als Beize an, ohne besonderen Erfolg.

Sclavo (C. f. B. 1894, S. 507) veränderte die Löffler'sche Methode, indem er Tannin-Phosphorwolframsäure als Beize benutzt, unvorteilhaft.

Bunge's Beize (Fortschritte der Medizin 1894, No. 12, 17, 24) besteht aus 3 ccm konzentrierter wässeriger Tanninlösung, 1 ccm Liq. ferr. sesq., 20 ccm Wasser, 24 ccm konz. wässer. Fuchsinlösung, so viel Wasserstoffsuperoxyd, daß die Beize braun wird und wird direkt auf das Deckglas filtriert. Die fixierten Deckgläser werden $^1/_2$—1 Minute in 50 proz. Essigsäure getaucht, abgespült, getrocknet; gebeizt wird 2—3 mal durch 10 Sekunden langes Erwärmen bis zum Dampfaufsteigen, dann wird abgespült, getrocknet und mit Karbolgentianaviolett gefärbt. Zuletzt wird 1 Minute in 1 proz. Essigsäure differenziert.

Fischer's (Pringsh. Jahrb. 1895, S. 82) Beize besteht aus 3 g Tannin, 20 ccm Wasser, 4 ccm Eisensulfatlösung (1 : 2), 1 ccm konz. alkohol. Fuchsinlösung und leistet viel weniger, als die Beize Löfflfr's.

Auf die Methode von Trenkmann (Trenkmann, Die Färbung der Geißeln von Spirillen und Bazillen, C. f. B. 1890, Bd. VIII, S. 385 bis 389) gehe ich nicht ein, da sie sich nicht besonders bewährt hat. Trenkmann benutzt im Anschluß an die Gram'sche Methode neben Tannin Jod zur Beize und färbt mit Gentianaviolettlösung. Teppler (1891) benutzt eine Beize aus 20 g Tannin, 80 g Wasser, 15 g Chromsäurelösung 2,5 : 100. Nicolle et Cantacuzène (Annal. de l'Inst. Pasteur 1893) verwenden die Methode von Nicolle, benutzen aber statt der Anilinfarbe Ruthenium oxychloratum ammoniacale. Rossi (1901) benutzt eine Mischung von 2,5 g Tannin, 0,1 Ätzkali, 100 Wasser — Karbolsäure 2 g, Alkohol 10 g, Fuchsin 0,025 g, Wasser 100 g. Smith (1903) gebraucht eine Mischung von Tannin, Ammoniakalaun, Quecksilberchlorid und Fuchsin als Beize und färbt mit Gentianaviolett in Ammoniakalaunlösung.

Eine andere Methode der Geißelfärbung, bei welcher Tannin jedoch auch noch als Beize benutzt wurde, erfand van Ermengem. Er verfuhr zur Geißelfärbung folgendermaßen.

1. Beize: 1 Vol. 2 proz. Osmiumsäure, 2 Vol. 10—25 proz. Tanninlösung, event. 4—5 gtts. Eisessig auf 100 ccm. Die Beize soll mindestens mehrere Tage alt sein. Die Beize wird $^1/_2$ Stunde in der Kälte oder 5 Minuten bei 50—60° wirken gelassen. Nach Abspülen mit Wasser und dann Alkohol wird das Deckglas einige Sekunden in eine Silbernitratlösung gelegt.

2. Silberlösung: 0,25—0,5 proz. Silbernitratlösung. Aus dieser Lösung direkt in das Reduktionsbad.

3. Reduktionsbad: 5 g Gallussäure, 3 g Tannin, 100 g geschmolz. Natriumacetat, 350 g Wasser. Im Reduktionsbade verbleibt das Deckglas einige Sekunden, um dann direkt wieder ohne Abspülen in die Silberlösung gelegt zu werden.

Man bewegt die Silberlösung fortwährend und nimmt das Deckglas heraus, wenn die Lösung sich zu schwärzen beginnt. Nach dem Abwaschen in Wasser trocknet man das Präparat und legt es ein. Eventuell kann nachträglich Verstärkung mit Quecksilber, Goldbad etc. angewandt werden. Zettnow (1899, S. 96), der Ermengem's Verfahren prüfte, erklärt es für unzweckmäßig, ebenso verwirft er das Verfahren von Bowhill.

Hinterberger (1900) modifiziert die van Ermengem'sche Färbungsmethode. Er badet die gebeizten Deckgläser in einer alkoholischen Silberlösung und entfernt durch wässerige Kochsalzlösung und Ammoniak

den Silberüberschuß, der nicht in den Geißeln sitzt, ehe er zur Benutzung des Reduktionsbades schreitet. Schließlich wendet er auch ein Goldbad an. KUNTZE (1902) sagt über HINTERBERGER's Verfahren: „HINTERBERGER hat an Stelle des Goldchlorides zur Beseitigung der Niederschläge die Behandlung mit 7 promilliger Kochsalzlösung und Abspülen mit verdünntem Ammoniak benutzt. Dieses Verfahren leistet auch an sich Vorzügliches, aber die Präparate sind oft nicht recht haltbar und verblassen, wohl unter dem Einflusse des Ammoniaks, schon nach kurzer Zeit.“

KUNTZE (1902) schließt sich wesentlich an ERMENGEM an. Als Silberlösung (2) gebraucht er eine 1 prozentige Lösung von Silbernitrat in 90—96 prozentigem Alkohol. Die Methode von KUNTZE liefert brauchbare Resultate, hat jedoch vor der LÖFFLER's, wie wir sie anwenden, nichts voraus und leidet daran, daß die Bakterien leicht abgespült werden.

In jedem Falle aber darf die Goldlösung nur ganz kurz einwirken und muß nachher auf das sorgfältigste wieder entfernt werden. Sollen die Geißeln dann die gewünschte Färbung zeigen, so ist es außerdem zweckmäßig, die Präparate einige Tage hindurch am Lichte liegen zu lassen, da die Reduktion des Goldes viel langsamer erfolgt als die des Silbers.

1899 empfiehlt ZETTNOW folgende Methode, welche er, angeregt durch ERMENGEM's und WELKE's Versuche, ausgearbeitet hat.

Die Lösungen. a) Beize. 5 g Tannin wird in 100 ccm Wasser gelöst, auf 30—40° im Wasserbade erhitzt und darin auf dieser Temperatur erhalten. Man löst 1 g Brechweinstein (Tartarus stibiatus) in einem Reagensglase in heißem Wasser und setzt von dieser Lösung so lange zu der warmen Tanninlösung, bis der Niederschlag von gerbsaurem Antimonoxyd, auch beim Umschütteln, dauernd bleibt. Man filtriert warm. Erscheint die Beize nach dem Erkalten mehr als stark opalisierend, also undurchsichtig trübe, so setzt man solange etwas Tannin zu der erwärmten Beize, bis sie nur noch stark opalisierend erscheint.

b) Silberlösung. 5 g Silbernitrat werden in 30 ccm destilliertem Wasser aufgelöst und zu dieser kalten Lösung wird eine kalte Lösung von 5 g Magnesiumsulfat hinzugefügt. Nach $^1/_2$ Stunde gießt man die Flüssigkeit vom Niederschlage ab und wäscht ihn dreimal mit 20 ccm destilliertem Wasser aus.

Den Niederschlag übergießt man mit 500 ccm kaltem, destilliertem Wasser und läßt dieses sich mit dem Silbersulfat völlig sättigen. Von dieser Lösung gießt man 50 ccm in eine 200 ccm-Flasche, setzt gleich viel destilliertes Wasser und dann so lange von einer (käuflichen) 30 prozentigen wässerigen Lösung des Aethylamin hinzu, bis der zuerst entstandene, braunschwarze Niederschlag sich wieder gelöst hat und die Flüssigkeit völlig klar geworden ist; hierauf fügt man vorsichtig und tropfenweise von neuem Silbersulfat hinzu; in den oberen Schichten der Flüssigkeit bildet sich dann wieder ein Niederschlag von Silberoxyd, der sich zuerst leicht beim Umschwenken der Flüssigkeit löst, dann schwerer. Man hält nun mit dem Zusetzen des Silbersulfates inne, ehe der Niederschlag bleibend wird; hat man den Zusatz des Silbersulfates überstürzt, so kann man den Fehler durch Hinzufügen von 0,5—1 Tropfen Aethylamin wieder gut machen und von neuem mit dem Zusatze des Silbersulfates beginnen. Die Lösung muß zuletzt vollkommen klar und farblos aussehen.

c) Lösung zur Quecksilberchloridverstärkung. I. 1. Th. Quecksilberchlorid + 100 g destill. Wasser. II. A. 2 g krystallisierte Soda + 100 g destill. Wasser; B. 1 g Pyrogallol + 20 ccm Alkohol + 2 Tropfen Eisessig.

Behandlung des Präparates. a. Herstellung des Ausstriches. Die aeroben Arten werden auf der Oberfläche einer nicht sehr steifen Agarplatte oder in dünner Schicht von Bouillon, den Boden eines Kolbens bedeckend, gezogen; die anaeroben stets in letzterer. Zur Aussaat wird Material aus frischen Kulturen benutzt und die junge, meist 10—20 Stunden alte Kultur abgetötet, indem die Bakterien von der Platte mit Wasser abgespritzt und die trübe Flüssigkeit mit Formalin versetzt wird. Vorher hatte die mikroskopische Beobachtung gezeigt, dass die Bakterien gut beweglich waren. Bouillonkulturen werden vorsichtig von einem etwaigen Bodensatz ab- und in einige Kubikzentimeter 4 proz. Formalins gegossen. Bringt man die Flüssigkeit mit den abgetöteten Bakterien in ein Spitzglas, so setzt sich die Hauptmasse der letzteren in 24 bis 72 Stunden ab. Den Absatz in der Spitze des Glases schwemmt man hierauf mit einprozentiger Formalinlösung auf und wiederholt das Verfahren noch zweimal, zuletzt mit reinem, sterilem Wasser.

Das Ausschleudern der Bakterien führt schneller zum Ziel, als das Absetzenlassen derselben, empfiehlt sich jedoch nur für Arten mit wenig Geißeln; an Bewegungsorganen reiche büßen die Hauptmasse der Geißeln ein.

b. Beizung. Das Präparat wird mit Wasser abgespült, dann die bestrichene Seite nach unten gekehrt in ein Blockschälchen gelegt, mit der eventuell durch Erhitzen im Reagensglase geklärten Beize übergossen und 5—10 Minuten auf eine 70—80° heisse Platte gesetzt, nachdem das Schälchen bedeckt ist. Hierauf spült man das Deckgläschen unter dem Wasserstrahle gut ab.

c. Niederschlagen des Silbers. Man bringt 4—5 Tropfen der Silberlösung auf das gebeizte Präparat und erwärmt zuletzt bis zur kräftigen Dampfbildung.

Nachdem man sich durch das Mikroskop überzeugt hat, welche Kraft der Färbung die Geißeln besitzen, kann man die Färbung nötigenfalls verstärken. Zeigen die Geißeln nur ein hell- oder dunkelgelbes Aussehen, so hat man nicht stark genug erhitzt und kann mit neuer Flüssigkeit das Verfahren wiederholen; hat sich ein Niederschlag gebildet, so ist meist die Erhitzung zu stark gewesen und das Präparat verloren.

d. Verstärkung mit Quecksilberchlorid. Man bringt auf das Präparat 4—5 Tropfen Sublimatlösung 1 : 100 und lässt 1 Minute einwirken. Hierauf spült man mit Wasser ab und setzt 4 Tropfen Soda- und 1—2 Tropfen Pyrogalluslösung auf das Deckglas. Nach 1 Minute, eventuell unter schwachem Erwärmen, spült man mit Wasser ab.

Zettnow erhält nach dieser Methode ganz vortreffliche Präparate, jedoch ist die Methode für unsere Zwecke etwas zu umständlich und nicht sicherer als die gleich zu beschreibende Methode, welche allerdings niemals Präparate mit so reinem Grunde liefert wie die Zettnow'sche.

Ganz abweichend von allen vorigen Methoden ist die von Gemelli (1903). Er bedient sich folgender Lösungen: a) 0,25 Kaliumpermangat, 100 g Wasser; b) 20 g Chlorkalziumlösung (0,75 g, 100 g destill. Wasser), versetzt mit 1 g Neutralrotlösung (1 g Neutralrot, 100 g Wasser).

Eine Platinöse des Materials wird auf einem Uhrglase mit 5 ccm destill. Wasser verdünnt, mit der Masse werden Deckgläser beschickt

und über Chlorkalzium getrocknet. Sie werden dann 10—20 Minuten in die Lösung a gelegt, mit Wasser gewaschen und in der Lösung b 15, 20 bis 30 Minuten lang gefärbt. Die gewaschenen Präparate werden in Kanadabalsam untersucht.

Ich habe die Methode an Bacillus subtilis geprüft. Es ist zuerst zu bemerken, daß das Neutralrot von GRÜBLER, welches GEMELLI empfiehlt, durch Chlorkalzium in dem oben angegebenen Verhältnisse völlig ausgefällt wird, also nicht färben kann. Ich habe dann verschiedene, geringere Mengen des Chlorkalziums zur Färbeflüssigkeit hinzugesetzt und viele Versuche angestellt. Nur einmal habe ich schwach, aber gut gefärbte Geißeln in schön klarem Grunde erhalten. Die Methode ist der genaueren Durcharbeitung wohl wert, so aber noch nicht brauchbar.

Uebung 20.
Ausführung einiger Geisselfärbungen.

Wir benutzen zur Geißelfärbung im wesentlichen die LÖFFLER'sche Methode. Bei der Ausführung werden wir vorzüglich auf folgende Punkte zu achten haben.

1. Die Bakterien, welche wir untersuchen, müssen gute Geißeln besitzen; sie müssen am besten in lebhafter Schwärmbewegung begriffen sein, jedoch ist auch Rücksicht darauf zu nehmen, daß die Geißeln in etwas älteren Kulturen oft kräftiger sind als die in ganz jungen, aus abgekochtem Sporenmateriale entstandenen. Wir müssen also Kulturen herstellen, welche gute Schwärmzustände enthalten. Dazu haben wir die Biologie der Spezies möglichst ins Auge zu fassen. Wir müssen jedoch beachten, daß auch Geißeln an nicht schwärmenden Oidien vorkommen können. Schwärmen die Spezies schlecht, so kann man sie nach ELLIS manchmal zum lebhafteren Schwärmen bringen, wenn man sie öfter täglich auf neues Substrat überimpft. 2. Die Geißeln dürfen beim Verdünnen der Lösung und beim Eintrocknen nicht abgeworfen werden. Das Abwerfen erfolgt bei einigen Bakterien leichter als bei anderen, kann durch Konzentrationsänderungen der Nährlösungen, durch Temperaturänderungen, durch Sauerstoffzutritt (bei Anaeroben) etc. bewirkt werden (MIGULA S. 106). Das Abwerfen der Geißeln wird am besten vermieden, wenn man die bakterienhaltige Flüssigkeit in äußerst dünner Schicht auf das vollkommen reine Deckglas aufträgt, so daß schnellstes Trocknen erfolgt. Bei langsamem Trocknen des Deckglases werfen sehr viele Bakterien ihre Geißeln ab. Vorteilhaft ist es, die Spezies möglichst bei der Temperatur zu züchten, bei welcher das Antrocknen der Ausstriche erfolgen soll oder sie wenigstens vor dem Gebrauche eine Zeit lang bei passender niederer Temperatur stehen zu lassen, wenn sie nur bei höherer wachsen. Es ist zweckmäßig, schon von vornherein eine möglichst dünne Nährlösung anzuwenden, und man thut deshalb gut zur Herstellung der zur Geißelfärbung bestimmten Kulturen frisch hergestellte Agarröhrchen zu benutzen, alte wenigstens vorher umzuschmelzen. Auch ist es eventuell gut, Agar mit der halben Nährstoffmenge im Wasser besonders zu bereiten. 3. Die Geißeln müssen an das Deckglas festgeklebt und möglichst unverändert fixiert werden. Gewöhnlich zieht man zum Zwecke der Fixierung die Deckgläschen dreimal hintereinander durch die Bunsenflamme oder erhitzt 2 bis 10 Minuten auf 120°—130° im Trockenschranke; das ist aber für manche

Geißeln eine zu hohe Erhitzung, und man kommt völlig damit aus, wenn man die trockenen Präparate 5 Minuten bei 40—50° gut austrocknet. Das Festkleben wird wesentlich durch absolute Reinheit der Deckgläschen gefördert. 4. Die bakterienhaltige Flüssigkeit muß möglichst frei von anderen leicht färbbaren Stoffen wie Schleimen und Eiweißstoffen sein. Man muß deshalb die Kulturflüssigkeit möglichst verdünnen, ehe man sie aufstreicht. Aus diesem Grunde ist zur Geißelfärbung Material von Gelatinekulturen unzweckmäßig, welches auch leicht durch von Fermenten verflüssigte Gelatine verunreinigt wird, und Bouillonkultur noch weniger geeignet, weil sich zu wenig Bakterien in der Nährstofflösung befinden. 5. Die Beize darf die Geißeln nicht zerstören. Es ist deshalb zweckmäßig, die Präparate mit der Beize nicht zu erhitzen, sondern die Beize kalt einwirken zu lassen. 6. Die Farbstofflösung muß die gebeizten Geißeln intensiv färben. Als passende Farbstofflösungen sind in letzter Zeit vorzüglich in den bakteriologischen Instituten verwandt worden:

a. Fuchsinlösung: 1 konz. alkohol. Fuchsinlösung + 10 Wasser.
b. Karbolfuchsinlösung (Ziehl'sche Lösung, eigentl. Neelsen'sche Lösung).
c. Mischung von 10 Anilinwasser + 1 konz. alkohol. Fuchsinlösung (Ehrlich'sche Lösung).
d. Gesättigte Lösung von Fuchsin in Anilinwasser.

Alle diese Lösungen werden auf dem Deckglase mäßig, bis zur beginnenden Dampfentwicklung erwärmt. Dadurch entsteht bei allen eine Uebersättigung, der eine intensivere Färbekraft entspricht. Die Färbekraft ist übrigens bei *a* am geringsten, bei *d* am stärksten, bei *b* und *c* dazwischen liegend. Am haltbarsten ist die Karbolfuchsinlösung, die jedoch leicht große Körner in das Präparat bringt; die Anilinwasserlösungen sind, wenn sie frisch bereitet sind, geneigt, feine Niederschläge zu geben.

Mir hat sich von allen Farbstofflösungen am besten eine Lösung von 1 gr Säureviolett 6B der Farbenfabrik von Fr. Bayer & Co. in Elberfeld in 150 ccm 50 % Alkohol bewährt.

Zur Fixierung der Bakterien benutzen wir ein kleines, auf 40° zu erwärmendes Wasserbad, dem ich folgende Form gegeben habe:

Es besteht aus einem aus Messing hergestellten Kästchen von 10,5 cm Durchmesser und kreisförmigem Querschnitt, dessen Seitenwand 4 cm hoch ist, dessen unterer Boden jedoch erst 2 cm über dem unteren Rande eingelötet ist. Das Kästchen ist an einem Stative mit einem Arme (*h*, Fig. 29) befestigt, der auf- und abstellbar ist. Der Arm *h* steht horizontal, das Kästchen ist jedoch etwas nach vorn geneigt an ihm befestigt, so daß sein hinterer Rand ungefähr 5 mm höher über der Horizontalen liegt als der vordere. An der höchsten Stelle des Kästchens, über der Ansatzstelle des Armes, ist ein Tubus (*t*) von 2,5 cm lichter Weite und 6,5 cm Höhe angebracht. Das Kästchen wird völlig mit Wasser gefüllt, so daß das Wasser im Tubus steht. In den Tubus wird mittelst eines lose aufsitzenden oder seitlich eingeschnittenen Stöpsels ein ungefähr 18 cm langes, 5 mm dickes Thermometer (6—110°) eingesetzt. Man heizt das Bad also auf 40° mit einem kleinen Bunsenbrenner an und läßt dann die Mikroflamme zum Weiterheizen brennen. Durch Hoch- und Niedrigstellen des Kästchens läßt sich die Temperatur leicht regulieren. Will man den Apparat mittelst siedender Flüssigkeiten auf konstanter Temperatur erhalten, so füllt

man ihn mit einer solchen und setzt ein großes Glasrohr an Stelle des Thermometers mittelst eines Korkes auf, eventuell einen Kühler.

An demselben Stative kann auch zugleich ein kleiner Arm mit Halter (*sp*) angebracht werden, der die Spitze des S. 112 beschriebenen Spülapparates trägt.

Wir verfahren nun zur Ausführung der Uebung folgendermaßen:

Als Uebungsmaterial eignen sich alle gut schwärmenden, wenig Schleim bildenden Spezies. Wir verwenden Bacillus subtilis oder Bacillus tumescens. Reichliches Sporenmaterial alter Kulturen wird in einem kleinen Reagensglase, mit ganz wenig sterilem Wasser oder steriler Nährlösung verdünnt, 2 Minuten im kochenden Wasserbade erhitzt, abends 6 Uhr auf die schräge Fläche eines möglichst frischen Agarröhrchens (Agar ohne Dextrose) aufgestrichen und das Gläschen in den Brutschrank (28°) gestellt. Am anderen Morgen um 8—10 Uhr (nach 12—14 Stunden) wird die Geißelfärbung vorgenommen.

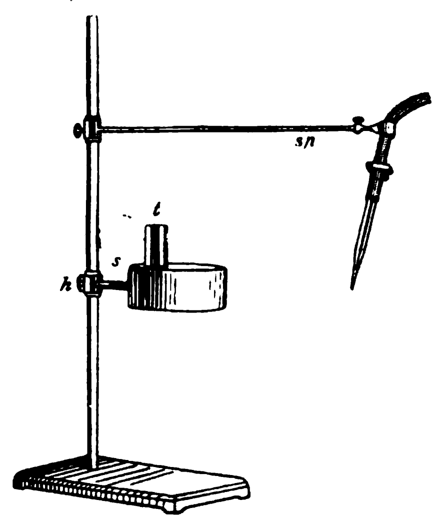


Fig. 29. Wärmeapparat für Deckglaspräparate nach ARTHUR MEYER. (Zu beziehen von ALTMANN.)

Wir haben uns folgende Farblösungen bereit gestellt:

1. Beize (LOEFFLER's Fuchsintinte).

4 g Tannin werden in 16 ccm Wasser in einem Glaskölbchen unter Erwärmen gelöst. Es werden hinzugefügt 10 ccm einer kalt gesättigten Eisenvitriollösung und 2 ccm einer kalt gesättigten Lösung von Fuchsin in 95-prozentigem Alkohol. Die Lösung wird in eine gewöhnliche Glasflasche gegossen, auf deren Hals ein Trichterchen mit Filter gestellt wird. Beim Gebrauche filtriert man einige Tropfen der Flüssigkeit direkt auf das Objekt. Die Beize wirkt gut, wenn sie einen Tag alt ist und hält sich ziemlich lange.

2. Farblösung.

1 g Säureviolett 6B v. BAYER & Co. (Unter genanntem Namen von SIEBERT und ZIEGENBEIN in Marburg a. L. oder unter dem Namen Säureviolett 1897, Ersatz für Hoffmannsblau, von GRÜBLER & Co. zu beziehen), 75 ccm 95-prozentiger Alkohol, 75 ccm dest. Wasser.

Wir haben uns ferner reine Deckgläschen hergestellt. Besitzen wir gute, schon ziemlich fettfreie, neue Deckgläser, so genügt es oft, sie in folgender Weise zu reinigen: Wir legen sie in 95-prozentigen Alkohol, reiben sie zwischen Fließpapier trocken und ziehen sie, indem wir sie mit der Cornetpincette fassen, senkrecht durch die Flamme, so daß sie recht heiß werden und eventuell schwach an den Kanten schmelzen, sich jedoch nicht verziehen. Sind die Gläser nicht besonders gut, so reinigen wir einige Dutzend in folgender Weise. Wir stellen ein 8—10 ccm weites Becherglas, dessen Boden 1 oder 2 cm hoch

mit einer Lösung von 6 g Kaliumbichromat in 100 ccm Wasser und 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure bedeckt ist, in das Dampfbad und werfen die Deckgläser einzeln in die Lösung. Wir lassen die Gläschen, unter öfterem Umschwenken, ein paar Stunden in der Flüssigkeit, gießen letztere dann ab und waschen mit destilliertem Wasser so lange nach, bis jede Spur der Lösung entfernt ist. Hierauf gießen wir eine Lösung von 5 g Ätzkali in 50 ccm 95-prozentigem Alkohol auf die Deckgläser, erwärmen das mit einer Glasplatte zugedeckte Becherglas etwas im Dampfbade und lassen die Flüssigkeit dann (unter Umschwenken) noch eine Viertelstunde kalt einwirken. Die Kalilösung gießen wir ab und waschen wieder mit destilliertem Wasser, bis die alkalische Reaktion verschwunden ist. Hierauf spülen wir die Gläser noch tüchtig mit 50 ccm 95-prozentigem Spiritus, dem wir fünf Tropfen Eisessig zugesetzt haben, gießen den sauren Alkohol ab, waschen mit 50 ccm Spiritus gut nach und übertragen dann die Gläschen einzeln mit der abgeputzten, reinen Pincette in 50 ccm absoluten Alkohol. Aus diesem bringen wir sie zuletzt in ein weithalsiges Glas mit Aether. Gebrauchen wir ein Deckglas, so ziehen wir es schnell einmal durch die Flamme, ohne es stark zu erhitzen.

Drei der ganz reinen Deckgläser, auf denen eine ausgestrichene Spur Wasser sich nicht zusammenziehen darf, beschicken wir nun in folgender Weise mit Material.

Zuerst prüfen wir unser Material auf die Schwärmfähigkeit, indem wir von der Mitte der Agaroberfläche eine Spur mit der Öse wegnehmen, in ein sehr kleines Tröpfchen Wasser auf den Objektträger bringen und mit Objektiv *E* (V½ Seibert) direkt beobachten. Schwärmt das Material gut, so bringen wir zuerst ein Tröpfchen Brunnenwasser mit der sterilen Platinöse auf ein reines Deckglas und mischen eine Spur Bakterienmaterial hinzu.

In diese Bakterienflüssigkeit tauchen wir das Ende einer Platinnadel flach ein, so daß etwas der Flüssigkeit daran hängen bleibt. Dann nehmen wir ein Deckglas in die Cornetpincette und streichen die Spur der Flüssigkeit schnell, mit einem Striche, auf dem Deckglas aus, so daß sie eine äußerst dünne, gleichmäßige Schicht bildet.

Wir legen die Gläschen mit der bakterienfreien Seite auf den Wärmeapparat, der genau auf 40° erwärmt ist, trocknen sie und lassen sie dann noch 5 Minuten lang liegen, um die Bakterien zu fixieren.

Wir nehmen eins der Deckgläser mit der Cornetpincette, gießen auf ein in einem kleinen Trichterchen liegendes Filter, welches wir auf ein Reagensglas gesetzt haben, etwas von der Beize und lassen diese auf das Deckglas auflaufen, so daß ein großer Tropfen dasselbe bedeckt. Die Beize bleibt 3—5 Minuten auf den Bakterien stehen, ohne erwärmt zu werden.

Die Beize spülen wir nach 2—5 Minuten tüchtig mit dem Wasserstrahl ab und saugen das Waschwasser gut mit etwas Fließpapier vom Rande des Deckglases aus ab oder blasen es ab und färben sofort, ehe das Deckglas trocken ist.

Wir bringen zu dem Zwecke einen großen Tropfen Farbstofflösung auf das Deckglas, welches wir mit der Cornetpincette halten, und erwärmen das Deckglas dann über dem Mikrobrenner ganz schwach, so daß eine schwache Dampfbildung eintritt, kein Kochen. Dabei

neigen wir das Deckglas fortgesetzt, um die Flüssigkeit etwas in Bewegung zu erhalten. Wir lassen es dann 2—3 Minuten stehen.

Wir spülen die Farbstofflösung hierauf mit dem Wasserstrahle sehr gut ab, nehmen das Waschwasser etwas durch Ablaufenlassen auf Fließpapier weg und trocknen das Präparat auf dem Wärmeapparate.

Wir bringen ein Tröpfchen Xylol auf den Objektträger und legen das Deckglas mit der gefärbten Seite darauf. Wir untersuchen das Präparat mit der Immersion. Ist es gut, so bringen wir auf einen anderen Objektträger ein Tröpfchen Kanadabalsam und legen das Präparat mit der gefärbten Seite auf denselben, um es so aufzubewahren und der genaueren Untersuchung zugänglicher zu machen.

Kapitel XIX.
Die Tötungszeit für die Sporen.

Allgemeines.

Es ist eine sichergestellte Erfahrung, daß die Sporen der verschiedenen Bakterien im feuchten Zustande einer bestimmten höheren Temperatur sehr verschieden lange widerstehen können und daß die verschiedenen Sporenspezies gleiche Zeit hindurch eine verschieden hohe Temperatur zu ertragen vermögen. Je höher in letzterem Falle die Temperatur ist, welche eine Spezies die bestimmte Zeit aushält, um so länger widersteht sie im allgemeinen der Einwirkung einer bestimmten höheren Temperatur. Einer niederen Tötungstemperatur widerstehen die Sporen länger als einer höheren. Das Verhalten der Sporen einer Spezies gegenüber Temperatur und Erhitzungszeit ist anscheinend bis zu einem gewissen Grade konstant, so daß dasselbe zur Charakterisierung der Spezies, herbeigezogen werden kann. Vorzüglich eignet sich die Feststellung der Zeit, welche eine Sporenspezies auf 80° und 100° erhitzt werden muß, bis Absterben der Sporen eintritt, zur Charakterisierung der Spezies, und ist die Feststellung dieser Zeiten auch deshalb von Bedeutung, weil die Kenntnis dieser Zeit es uns ermöglicht, das Erhitzen der Sporen zum Zwecke des Anlegens von Kulturen, deren Entwickelung wir studieren wollen, in zweckmässiger Weise vorzunehmen. In letzerer Beziehung ist auch die Kenntnis der Tötungszeit der Oidien von Bedeutung.

Zuletzt ist die Kenntnis der Tötungszeit der Sporen deshalb von Interesse, weil uns dieselbe unter Umständen gestattet, die Kultur einer Spezies durch genügend lange Erhitzung von manchen anderen Spezies direkt zu trennen.

Es mögen zuerst einige Beispiele für die Tötungszeit bestimmter Sporen für Erhitzung in Flüssigkeit oder übersättigtem Dampf bei 100° gegeben werden.

Es werden getötet bei 100°:

die Sporen von 19 von DANNAPPEL untersuchten Spezies in 5—15, 30, 60 Sekunden;



Milzbrandsporen in 2 Minuten (in 1 Minute noch nicht: GEPPERT, Berlin. klin. Wochenschr. 1890, No. 11) bis 12 Minuten (ESMARCH., Zeitschr. f. Hygiene 1888);

Tetanussporen in 5 Minuten;

Sporen von Bacillus mesentericus vulgatus in 3 Stunden (STRUB, Centralbl. f. Bakt. 1890);

Sporen des roten Kartoffelbazillus in $5^1/_2$ bis 6 Stunden (GLOBIG, 1887);

manche Bodenbakteriensporen in 16 Stunden noch nicht (CHRISTEN, 1895);

Bei 80° sterben:

Tetanussporen in 1 Stunde.

Oidien und Zellfäden sind gegen höhere Temperaturen empfindlicher als Sporen. Im allgemeinen sterben die Oidien schon in 10 bis 15 Minuten bei 50—60° ab (FLÜGGE, S. 435; GÜNTHER, 1898, S. 29).

Dabei scheint jedoch schon zwischen den Schwärmern und Ruhestäbchen ein Unterschied zu bestehen, denn ZOPF (1892) fand, daß die Schwärmer von Bacterium vernicosum bei 75° sofort abstarben, während die Ruhestäbchen erst über 87° sofort getötet wurden.

Eine 10 Minuten lange Erwärmung genügt zur Tötung der Oidien von

Spirillum Finkler Prior	bei	50°	(STERNBERG, 1892),
Rotzbazillus	„	55°	(LÖFFLER),
Mäusetyphus	„	58°,	
Sarcina lutea	„	64°.	

Jedoch haben manche Bakterien bei 75° ihr Wachstumsoptimum (GLOBIG, RABINOWITSCH). Der Tuberkelbazillus wird bei 60° in 45 bis 60 Minuten, bei 70° in 5—10 Minuten getötet.

Erhitzt man die Oidien von Bacillus asterosporus in unseren ganz kleinen Reagensgläsern in einem kochenden Wasserbade, so sind nach 12 Sekunden alle Oidien abgestorben; bei 80° sterben sie sicher nach 30 Sekunden ab.

Uebung 21.

Die Bestimmung der Tötungszeit für 100° und für 80°.

Bestimmung der Tötungszeit für 100°. Wir sterilisieren zuerst einige mit Baumwollenbausch verschlossene Reagensgläser von 8 bis 9 cm Länge und 8 bis 9 mm innerer Weite im Heißluftschranke. Statt die Röhren vor der Sterilisation mit Baumwolle zu schließen, kann man sie auch mit einem Stückchen Filtrierpapier und darüber mit einem Stückchen Staniol fest überdecken und diese Kappe dann nach dem Sterilisieren mit einem dünnen Gummiband umschlingen. Die sterilen Reagensgläschen füllen wir 1 cm hoch (nicht höher) mit sterilem Wasser an, impfen sie mit 14 Tage altem Sporenmateriale von Bacillus asterosporus [1]) und erhitzen sie sofort in einem siedenden Wasserbade. Wir erhitzen also zu dem Zwecke in einem kupfernen Wasserbade von 8 cm Weite und 10 cm Höhe Wasser zum Sieden, stecken die zu erhitzenden Röhrchen in die 9 mm weiten, kreisrunden Löcher einer 1 cm dicken,

1) Bacillus asterosporus dient hier nur als Beispiel. Für die Uebung wird zweckmässigerweise eine dem Uebenden unbekannte Spezies verwandt.



kreisförmigen Korkplatte von 8 cm Durchmesser und setzen die Platte mit den Röhrchen in das siedende Wasser. Den Zeitmoment des Eintauchens notieren wir uns und nehmen nach Ablauf der Zeit, während welcher ein Glas erhitzt werden soll, das Glas heraus, um es sofort in ein Glas mit kaltem Wasser einzusetzen.

Sporen bei 100°. In dieser Weise beschicken wir nun zuerst 4 Reagensgläschen mit der Nährlösung, impfen sie und erhitzen sie

1) 120, 240, 360, 480 Sekunden. Wir nehmen dann die Gläschen heraus und erhitzen die ganze obere Partie über dem Wasser, um alle etwa oben sitzenden, nicht im Wasser erhitzten Sporen abzutöten. Wir nehmen dann den Baumwollenpfropfen ab, erhitzen den Rand und gießen hierauf die ganze Flüssigkeit auf die Oberfläche einer Agarröhre aus. Wir lassen sie bei 28° stehen und untersuchen sie nach 4 Tagen sowohl makroskopisch auf die Entwicklung, als mikroskopisch auf die Reinheit der Kultur. Letzteres deshalb, weil es ja möglich wäre, daß die Kultur mit einer widerstandsfähigeren Sporenspezies verunreinigt worden wäre. Wir untersuchen die Kulturen, welche sich nicht entwickelt hatten, nach 8 Tagen noch einmal, da die Keimung der erhitzten Sporen verzögert ist. Wir werden dann wahrscheinlich finden, daß nur die 480 Sekunden erhitzten Sporen sich nicht entwickelt haben, daß also ist: 120 +, 240 +, 300 +, 480 —.

Wir wiederholen, um die Tötungszeit genauer zu bestimmen, den Versuch mit 5 Gläsern und den Zeiten und dem Resultate:

2) 300 +, 360 +, 420 +, 480 —

hierauf mit den Zeiten und wahrscheinlich mit dem Resultate:

3) 390 +, 420 —, 450 —, 480 —

und schließlich mit den Zeiten und dem Resultate:

4) 400 +, 410 —, 420 —, 430 —.

So erhalten wir das Resultat, daß die Tötungszeit bei 100° = 410 bis 430 Sekunden beträgt. Es ist aber möglich, daß wir ein wenig höhere Zahlen finden; denn die Tötungszeit für Bacillus asterosporus variiert etwas.



Fig. 30. Thermostat nach dem Prinzip des Trockenapparates von Viktor Meyer. Bei Bestellung ist zu betonen, dass er mit den von mir angegebenen Änderungen hergestellt sein müsse.

Die Bestimmung der Tötungszeit für 80°. Wir benutzen zur Bestimmung der Tötungszeit bei 80° einen Thermostaten, welcher wesentlich nach dem Prinzipe des Trockenapparates von Viktor Meyer eingerichtet ist. Der Apparat (Fig. 30), den Altmann nach meiner Angabe besonders anfertigte, besitzt einen Arbeitsraum von 20 cm Höhe und 10 cm Weite. Er ist aus Kupfer gearbeitet, doppelwandig. In die doppelte Wand, deren Raum oben durch den mit Konus und Ueberschraube befestigten Rückflußkühler geschlossen ist, gießt man die zur Erhaltung der konstanten Temperatur bestimmte Flüssigkeit ein. An der Basis des Apparates befindet sich ein kleines Loch, durch welches, wenn man den Apparat als Trockenapparat benutzt, die Luft einströmt. Dieses Loch ist mit einer Schraube geschlossen, welche in

einem aufgelöteten Stückchen Messing sitzt. Der Deckel des Apparates besitzt eine dicke Einlage von Asbest und trägt den Tubus für das Thermometer. Zum Erhitzen benutzt man am besten einen guten Brenner mit Luftregulierung und Hahn oder einen Brenner, dessen Flamme mit der Luftregulierungshülse kleiner und größer gestellt werden kann, da die Flamme genau so zu regulieren ist, daß die eingefüllte Flüssigkeit gerade gut siedet. Die Temperatur im Apparate ist von dem Siedepunkte der eingefüllten Flüssigkeit abhängig.

Zur Füllung für eine konstante Temperatur im Innenraum von

60°	wird benutzt	Chloroform		136°	wird benutzt	Xylol
70°	„ „	Methyl-Aethylalkohol	3 : 7	150°	„ „	Anisöl
75°	„ „	Aethylalkohol		161°	„ „	Cumol
80°	„ „	Aethyl-Propylalkohol	7 : 4	180°	„ „	Anilin
90°	„ „	Aethyl-Propylalkohol	1 : 8	200°	„ „	Naphthalin
97—100°	wird benutzt	Wasser		30[illegible]°	„ „	Diphenylamin
107°	„ „	Toluol				

Wir brauchen eine Temperatur von 80° und füllen deshalb ein Gemisch von 7 Vol. Aethylalkohol und 4 Vol. Propylalkohol (97°.4) in die Doppelwandung ein. können auch, wenn wir vorsichtig verfahren, reines Benzol benutzen. Wir setzen dann den Kühler auf, verbinden die Einlaufröhre des Kühlers, welche tief in dessen Inneres hineinführt, mit dem Wasserhahne durch einen Schlauch, versehen das Ablaufrohr auch mit einem Gummischlauche und lassen nun das Wasser schnell durch den Kühler strömen. Hierauf zünden wir die Flamme an und erhitzen das Alkoholgemisch zum Sieden, welches nur so stark sein darf, daß der Kühler kaum warm wird und keine Alkoholdämpfe durch den Kühler entweichen. Hierauf füllen wir den Arbeitsraum des Apparates bis ungefähr 9 cm unter den Rand mit Wasser, stellen das Thermometer ein und beobachten, welche konstante Temperatur es nach einiger Zeit zeigt.

Ist die Temperatur zu hoch, so hilft man durch Nachgießen von etwas absolutem Alkohol nach, und umgekehrt setzt man Propylalkohol zu, wenn die Temperatur zu niedrig ist. Steht das Thermometer schließlich konstant auf 80°, so kann mit dem Erhitzen der Bakterien begonnen werden. Beim Außerdienststellen des Apparates ist zu beachten, daß man stets erst die Flamme ausdrehen muß, dann das Wasser noch so lange durch den Kühler strömen lassen muß, bis der Apparat erkaltet ist. Auch bei diesem Apparate benutzen wir zum Einstellen der Reagensgläser die früher beschriebene durchlöcherte Korkscheibe.

Sporen bei 80°. Wir impfen, wie früher, 5 sterile Reagensgläschen, welche etwas steriles Wasser enthalten, mit möglichst viel des Sporenmaterials von Bacillus asterosporus, schließen mit einem kleinen Stückchen sterilen Fließpapiers und mit einem größeren Stückchen Staniol, welches wir über das Fließpapier legen und mit einem Gummibändchen (Gummiring) festhalten, und erhitzen die folgenden Zeiten mit den angegebenen Resultaten auf 80°, wobei wir auch hier nach dem Erhitzen jedes Glas sofort in kaltes Wasser einstellen.

1) 2 +, 3 +, 4 +, 5 —, 6 — Stunden.
2) 3 +, 4 +, $4\frac{1}{4}$ +, $4\frac{1}{2}$ +, $4\frac{3}{4}$ —, 5 —.

Es läge dann also die Tötungszeit zwischen $4\frac{1}{2}$—$4\frac{3}{4}$ Stunden.

Nach vorläufigen Versuchen, welche Herr ELLIS in meinem Laboratorium ausführte, besitzen die in dem Folgenden angegebenen Spezies ungefähr die dabei stehenden Tötungszeiten:

		100°		80°	
Bacillus	tumescens	4—5	Minuten	5—5½	Stunden
„	cohaerens	4,5 - 5	„	8—8½	„
„	simplex	3—4	„	2⅔—2⅚	„
„	mycoides	10	„	8—8½	„
„	pumilis	6—7	„	7—7½	„
„	fusiformis	3—4	„	9—9½	„
„	Carotarum	4½—5½	„	6—6½	„
„	Ellenbachensis	1—2	„	7—7½	„
„	graveolens	7—10	„	9½—10	„
„	subtilis	150—180	„	45—70	„
„	ruminatus	1,75—2	„	—	„

Kapitel XX.

Uebung 22. Bestimmung einer Bakterienspezies.

Wir haben in der Uebung 11 eine oder einige aus dem Boden stammende Spezies isoliert, welche auf abgekochten Möhren wachsen. Wir wollen nun eine dieser Spezies bestimmen und die Bestimmung nach den Diagnosen ausführen, welche GOTTHEIL in seiner unter meiner Leitung ausgeführten Arbeit gibt (GOTTHEIL, Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien; Centralbl. f. Bakt. 1901, II. Abt., Bd. VII., No. 12, S. 430). Die von uns gefangenen Spezies werden wohl meist zu den von GOTTHEIL beschriebenen gehören; sollte das nicht der Fall sein, so können wir sie als neue, unbestimmbare betrachten, die einer Durcharbeitung bedürfen.

Wollen wir nach den nachher zu gebenden Diagnosen unsere Spezies bestimmen, so haben wir folgende Punkte zu beachten:

1. Von der Reinkultur aus muß die Kultur mindestens 4 Wochen lang auf D-Agar weiter gezüchtet werden, wobei sofort nach dem Ausreifen der Sporen einer Kultur mit abgekochtem Sporenmaterial umgeimpft werden muß. Nur so wird eine aus dem Boden isolierte Kultur die in der Diagnose beschriebenen Eigenschaften annehmen.

2. Die Kultur der Spezies muß vollständig rein sein. Sie wird deshalb vor der Bestimmung mindestens noch einmal auf die Gelatineplatte gebracht (siehe Seite 70), und von einer isoliert liegenden Kolonie werden dann 2 Agarröhrchen geimpft. Sind die Sporen entwickelt, so werden sie abgekocht und 3 Agarröhrchen mit ihnen beimpft, die das Material für die Untersuchungen abgeben.

3. Soll die Entwicklungsgeschichte der Spezies beobachtet werden, so muß von mindestens 4 Wochen altem Sporenmateriale ausgegangen werden, welches genau 2 Minuten im Wasserbade erhitzt wurde.

4. Die Agarkulturen müssen bei 28°, die Gelatinekulturen und Möhrenkulturen bei 17,5° gehalten werden.

5. Wir müssen zur Erkennung der Spezies Bilder aller Entwicklungsstadien der Spezies bei derselben Vergrößerung herstellen, die GOTTHEIL benutzte (1800fach) und mit den Bildern, die GOTTHEIL

gibt, mindestens mit den Figuren 45—77 unserer Tafel vergleichen, wenn wir sicher zum Ziele kommen wollen. Wir benutzen die Ölimmersion und Okular 12 und erhöhen unseren Zeichenklotz so lange, bis die Grösse des Bildes des Objektmikrometers mit dem Maßstabe der GOTTHEILschen Tafeln stimmt (der Zeichenklotz muß dann etwa 16,3 cm hoch werden). Die Umrißlinien der stets lebend zu benutzenden, ungefärbten Sporen, Oidien etc. sind beim Zeichnen genau auf die Kontur des mikroskopischen Bildes zu setzen, nicht außerhalb oder innerhalb derselben zu ziehen. Nach den gewonnenen Zeichnungen führen wir direkt die Messungen aus.

Ich führe nun die verschiedenen Merkmale, die besonders für die Bestimmung festzustellen sind, ungefähr nach der Reihenfolge ihres Wertes an.

1. Verhalten der Spezies in Nährlösungen (Kap. II). Tritt in einer Nährlösung nach 14 Tagen keine Entwicklung ein, so impfen wir die Nährlösung nochmals nach und beobachten noch einmal nach 14 Tagen.
2. Sporenformen und Sporengrößen.
3. Die Reservestoffe, welche in jungen Sporangien auftreten (Kap. XII, XIII, XIV).
4. Keimungserscheinungen, Dicke der Keimstäbchen.
5. Der Entwicklungsgang der Spezies auf D-Agar, nach mikroskopischer Beobachtung (Kap. V).
6. Verflüssigung der Gelatine (Kap. VI).
7. Entwicklung von Säure oder Alkali (Kap. XV). GOTTHEIL hat den quantitativen Verlauf nicht genau verfolgt.
8. Aussehen und Entwicklung der Agarstrichkultur und Gelatinestichkultur, sowie der Möhrenkultur (Kap. V, VI).
9. Tötungszeit für die Sporen (Kap. XIX).
10. Gasentwicklung und Gasanalyse (Kap. XVI).
11. Geißelfärbung (Kap. XVIII).
12. Diastasebildung.

In dem Folgenden sind nun nur die kurzen Diagnosen, welche GOTTHEIL gab, die jedoch zur Bestimmung meist ausreichen werden, abgedruckt.

1. Bacillus ruminatus.

Spore. Sporengröße: 1,5—1,7 μ lang, 0,8—1 μ breit (ohne Hülle gemessen). Sporenform: ellipsoidisch, cylindrisch, schmal länglich; am häufigsten wie Fig 45 der farbigen Tafel. Die eben ausgeschlüpften Sporen sind von einer sich mit Methylenblau 1 + 10 stark färbenden, eigenartigen Hülle umgeben, die sich längere Zeit an den Sporen erhält. Starke Anschwellung der Sporen vor der Keimung (Fig. D). Sporenkeimung polar (Fig. 46). Die Keimstäbchen werden normalerweise bis 2- lang und 1,39—1,5 μ dick. Auf Agar, nach 7 Stunden bei 28°, findet man 2-, 4-, 6-, 8-, 12-, seltener bis 18-stäbige[1]) Zellfäden, deren Stäbe charakteristischerweise meistens 2-lang und 2-zellig sind; nach 15—16 Stunden Einzel- und Doppelstäbchen von normaler Dicke (1,39—1,5 μ), Stäbe 1- bis 2-lang[2]),

1) 2-, 4- etc. stäbiger Zellfaden heisst ein Zellfaden, der in 2-, 4- etc. an den Spitzen abgerundete Stäbchen (Oidien) gegliedert erscheint, die sich noch nicht voneinander getrennt haben. Die Stäbchen selbst können 1- bis mehrzellig sein.

2) Als 1-lang, 2-lang etc. bezeichne ich die Stäbchen oder Zellfäden, welche ungefähr einmal, zweimal etc. so lang sind wie normale Sporangien der Spezies.

2-zellig, viele Zellen äußerst kurz und bis 8-, seltener mehrstäbige Zellfäden, deren Stäbe häufig angeschwollen sind. Die Stäbchen von Bac. ruminatus a waren ungefähr 1,7—1,9 μ dick. Die Bakterien haben viele Fetttröpfchen gespeichert (Sudan-Methylenblaureaktion). Nach 20—24 Stunden ist schon teilweise Sporenbildung eingetreten. Nach 30—36 Stunden: sehr viele Sporangien, welche zum Teil, fertig entwickelt, fettfrei sind, deren Sporen die Hüllenfärbung geben (Methylenblaureaktion). Viele Stäbe von wechselnder Länge und Dicke, oft lange anormale, stark angeschwollene abgerundete Zellen. In älteren Agarkulturen findet man Involutionsformen. Schwärmezustand war vorhanden in den Nährlösungen V, Vα und VII. Die Schwärmer sind in diesen Nährlösungen 1- bis 2-lang und ungefähr 1,3 μ breit. Die Geißelfärbung ist schwer ausführbar. Die Stäbchen sind peritrich begeißelt. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen 0, I, Vα = 3—4, III, IV = 0—1 ist charakteristisch. Die Agarstrichkultur ist nach 20 Stunden weißlich, homogen (Bac. ruminatus), bis dickhäutig (Bac. ruminatus a); mehr oder weniger stark schleimig. Die Möhrenkultur ist nach ungefähr 4 Tagen glasig, scheimig-fadenziehend, nach 10 Tagen dick, weißgelblich, etwas häutig. Diastasebildung und schwache Säurebildung sind in Nährlösung V nach 4-wöchentlicher Entwicklung bei 28° nachweisbar. Die Gelatine wird relativ schnell verflüssigt.

2. Bacillus tumescens.

Spore. Sporengröße: 1,7—2 μ breit, 2,5—3 μ lang. Sporenform: Fig. 47 der Tafel. Die Sporenmembran ist ohne Hilfe eines Reagenses sichtbar; sie ist deutlich in Exine und Intine gegliedert. Die Sporen schwellen vor der Keimung nur relativ wenig an; die Keimung erfolgt äquatorial (Fig. 48). Die Keimstäbchen werden 2- bis 3-lang und 1,39—1,5, seltener bis 1,7 μ breit; nach einiger Zeit der Ruhe beginnen sie zu schwärmen. Auf Agar nach 7—8 Stunden bei 28° findet man bis 8-, seltener mehrstäbige Zellfäden, deren Stäbe 2- bis 3-lang sind; nach 20—24 Stunden Ruhestäbchen, welche oft stark angeschwollen sind und große Fetttröpfchen gespeichert haben, im Kondenswasser oft noch wenige, langsam schwärmende Stäbchen. Im oberen Teile der Agarkolonie sind Sporangien ausgebildet. Nach 36—40 Stunden sind außer normalen Sporangien charakteristischerweise noch mehrstäbige Zellfäden vorhanden, deren Stäbe angeschwollen und abgerundet sind und Sporen gebildet haben. An den nach Löffler gefärbten Schwärmern erkennt man an einem 2-langen Stäbchen bis 12 peritrich angelegte Geißeln. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen 0, I, II, V, Vα, Vβ, VII = 3—4 und III, IV, VIII, IX, XI = 0—1 ist charakteristisch. Agarstrichkultur. Nach 20—24 Stunden bei 28° ist eine homogene, relativ dicke, glänzende. mehr oder weniger stark schleimige Kolonie entwickelt; alte Agarkulturen werden graubraun. Möhrenkultur. Nach mehreren Tagen ist eine dicke, homogene, weißliche, mehr oder weniger stark schleimige Kolonie entwickelt. Diastasebildung (untersucht in Nährlösung I und V) und Säurebildung (untersucht in Nährlösung VII und V) sind nur schwach. Gasbildung findet nicht statt. Die Gelatine wird verflüssigt.

3. Bacillus graveolens.

Spore. Sporengröße: 1,39—1,7 μ breit, 1,9—2,5, selten 2,9 μ lang. Sporenform: Fig. 49, Sporenmembran in deutlich sichtbare Intine und Exine gegliedert. Meist nur relativ schwache Anschwellung der Sporen vor der Keimung; dieselben keimen vorherrschend seitlich. Die Keimstäbchen sind meistens 1- bis 2-lang und ungefähr 1,39—1,5 μ breit; nach kurzer Zeit der Ruhe beginnen sie zu schwärmen. Auf Agar, nach 7—8 Stunden bei 28°, sind Einzel-, Doppelstäbchen und bis 8-stäbige Zellfäden, deren Stäbe 2- bis 3-lang sind, entwickelt, nach 14—18 Stunden lebhaft schwärmende Einzel- und Doppelstäbchen, mit kleinen Fetttröpfchen, von normaler Dicke; Stäbe vorherrschend 1-, seltener 2-lang. Nach 20—24 Stunden sind meistens normale 1- bis 2-lange, oft lebhaft schwärmende, Einzel- und Doppelstäbchen, selten etwas angeschwollene Stäbe und bis 14-stäbige Zellfäden vorhanden. In vielen Stäbchen sind Sporen ausgebildet; viele Sporangien schwärmen lebhaft. Nach 36—40 Stunden sind im oberen Teile der Agarkolonie freiliegende Sporen, Sporangien und Ruhestäbchen entwickelt. Außer Einzel- und Doppelsporangien und mehrstäbigen Zellfäden mit aus einlangen Sporangien bestehenden, oft schon fettfreien Stäbchen von meistens normaler Dicke findet man jetzt auch anormal gestaltete, verschieden lange, dünnere und dickere Zellen. Die Schwärmer besitzen peritriche Begeißelung. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen Vα = 4, Vβ = 0—2, III, VII, IV = 0—1 ist charakteristisch. Die Agarstrichkultur ist nach 20—24 Stunden bei 28 deutlich häutig, meist relativ dünn, glatt, marmoriert oder etwas faltig; nach 4—5 Tagen besitzt die Agarkolonie meistens einen trimethylaminartigen Geruch. Die Möhrenkultur ist nach 5 Tagen homogen, weißlich, zähschleimig. Diastasebildung und Säurebildung sind in Nährlösung Vα vorhanden. Die Gelatine wird verflüssigt.

Da Bacillus graveolens dem Bacillus tumescens sehr nahe steht, so will ich noch kurz die wichtigsten Unterschiede zwischen diesen beiden Formen angeben:

.1. Bac. graveolens entwickelt auf Agar, nach 20—24 Stunden, bei 28° eine häutige Kolonie; ältere Agarkulturen besaßen meistens einen mehr- oder weniger starken trimethylamin-ähnlichen Geruch. Bac. tumescens zeigt dagegen nach gleicher Zeit eine homogene, weiße, dicke, schleimige, nicht häutige Kolonie; ältere Agarkulturen besaßen einen stinkenden, jedoch niemals trimethylaminartigen Geruch.

2. Bac. graveolens entwickelt auf einer Möhrenscheibe nach 24 Stunden kurze, meist 1-lange Einzel- und Doppelstäbchen mit Fetttröpfchen, fast keine mehrstäbigen Zellfäden, nach 5 Tagen Einzel- und Doppelstäbe, von denen viele noch lebhaft schwärmten, Ruhestäbchen, Sporangien und freiliegende Sporen. Bac. tumescens entwickelt dagegen nach 24 Stunden vorherrschend vielstäbige Zellfäden, deren Stäbe 1- bis 2-lang, 1- bis 2-zellig und mit Fetttröpfchen angefüllt sind; nach 5 Tagen vorherrschend vielstäbige Zellfäden mit relativ dicken, oft angeschwollenen Stäben.

3. Nach 14—18, selbst noch nach 20—24 Stunden findet man in der Agarkolonie von Bac. graveolens im Gegensatz zu Bac. tumescens viele lebhafte Schwärmer. Viele Stäbchen sind bei Bac. graveolens kürzer und schmäler als bei Bac. tumescens.

4. Die Sporangien, welche von Bac. graveolens auf Agar nach 24 Stunden bei 28° entwickelt werden, entsprechen der Fig. 50, viele Sporangien schwärmen; die Sporangien, welche von Bac. tumescens nach gleicher Zeit entwickelt werden, schwärmen normalerweise auf Agar nicht.

5. Bac. graveolens entwickelt in Nährlösung X, nach dem Impfen mit 14 stündigem Stäbchenmaterial von Agar, nach 7 Tagen, bei 28° vorherrschend normale kurze Einzel- und Doppelstäbchen; Bac. tumescens entwickelt dagegen unter gleichen Bedingungen 2- und 4-lange Stäbe.

6. Bac. graveolens entwickelt sich in Nährlösung Vβ schlecht; die Sporen keimen nicht, 14 Tage lang ist selbst nach Impfen mit gutem Stäbchenmaterial von Agar noch keine Entwicklung zu konstatieren, sondern erst nach 4 Wochen. Die Sporen von Bac. tumescens keimen dagegen in Nährlösung Vβ und die Entwicklung dieser Spezies geht in dieser Nährlösung normal von statten.

4. Bacillus Petasites.

Spore. Sporengröße: 0,83—1,11 μ breit, 1,7—2,2 μ lang. Sporenform: Ellipsoidisch, manchmal mit schwachen Spitzen, länglich, oft sichelförmig gekrümmt (Fig. 51); die Sporenmembran ist relativ dünn, gut nach Durchfärbung mit Fuchsin sichtbar; Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Vor der Keimung schwellen die Sporen stark an (Fig. 52). Die Keimung erfolgt in folgender Weise: 1. polar (Fig. 54); 2. seitlich, äquatorial; einseitiges Aufreißen der Sporenmembran, schnelles Wachstum des Keimstäbchens, Keimung mit kommaförmig gekrümmten Stäbchen; 3. seitlich, äquatorial; eine Längsseite der Sporenmembran reißt und das Stäbchen schlüpft häufig schräg heraus (Fig. 53b); 4. Streckung der Membran bis zur Stäbchenlänge und unregelmäßiges Zerreißen derselben; 5. selten äquatorial, ringförmiges Aufreißen der Sporenmembran, Streckung des Keimstäbchens, Membran als Kappen an den Polen desselben festhaftend (Fig. 53a). Die Keimstäbchen, welche nicht sofort schwärmen, werden 2- bis 3-lang und ungefähr 1,39—1,5 μ breit. Auf Agar nach 6—7 Stunden sind Einzel- und Doppelstäbchen und 4-, seltener bis 8-stäbige Zellfäden vorhanden, deren Stäbe homogen 2-lang und 2-zellig sind; nach 15—16 Stunden meistens lebhaft schwärmende Einzel-, Doppelstäbchen und bis 4-, äußerst selten bis 8-stäbige Zellfäden; Stäbchen mit Fetttröpfchen angefüllt; Zellen sehr häufig äußerst kurz (Chlorzinkjod) und von normaler Dicke; die Stäbe in den Zellfäden sind oft etwas angeschwollen. Nach 20—24 Stunden findet man im oberen Teile der Agarkolonie vorherrschend Sporangien; die in denselben oft schräg liegenden Sporen sind oval, meist länglich oder sichelförmig. Nach 36—40 Stunden findet man freiliegende Sporen, Sporangien und Ruhestäbchen; es sind vorherrschend Einzel- und Doppelsporangien, jetzt von sehr variabler Form, entweder stäbchenförmig 1- bis 2-lang oder oval, eiförmig; die Ruhestäbchen sind fast alle schmäler als die Keimstäbchen und laufen in charakteristischer Weise häufig spitz zu. Die Schwärmer besitzen peritriche Begeißelung. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen Vβ = 3—4, Vδ = 3, Vγ = 4 und III, IV, IX = 0 ist charakteristisch. Die Agarstrichkultur. Nach 15—20 Stunden weißlich, homogen, glänzend schleimig. Ältere, besonders bei Zimmertemperatur entwickelte Kolo-

nieen werden mehr oder weniger intensiv gelb, im oberen Teile manchmal rötlich. Die Möhrenkultur ist nach mehreren Tagen dick, glasig, mehr oder weniger stark schleimig fadenziehend. Alte Kolonien werden meistens gelb gefärbt. Starke Diastase- und Alkalibildung sind in Nährlösung Vβ vorhanden. Die Gelatine wird verflüssigt.

5. Bacillus Ellenbachensis.

Spore. Sporengröße: 0,83 μ breit, 1,7—2,2 μ lang. Sporenform: Fig. 55. Die Sporangienmembran bleibt lange erhalten; Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Relativ starke Anschwellung der Sporen vor der Keimung; sie keimen polar. Die Sporangienmembranen hängen bei der Keimung häufig noch an den Sporenmembranen fest (Fig. 56). Die Keimstäbchen werden bis 3-lang und ungefähr 1,11 μ breit; sofort nach der Keimung beginnen die Stäbchen lebhaft zu schwärmen. Auf Agar nach 6 Stunden sind Einzel-, Doppelstäbchen, seltener 6-stäbige Zellfäden entwickelt, deren Stäbe 1- bis 3-lang sind; nach 12—40 Stunden haben die Stäbchen viele kleine, oft aber auch bis sporengroße Fetttropfen gespeichert. Nach 20 Stunden sind vielstäbige Zellfäden vorhanden; die Stäbchen sind 1,39—1,5 μ breit; nach 40—64 Stunden sind Sporangien ausgebildet, 2- bis 10-, seltener mehrstäbige Zellfäden mit aus einlangen Sporangien bestehenden Stäbchen; meistens schwellen die fertig entwickelten, fettfreien Sporangien etwas an und runden sich ab (Fig. 57). An den nach Löffler gefärbten Schwärmern erkennt man peritriche Begeißelung.

Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen I, II, III = 2—4 und V, Vα, VI, VII, X = 0 ist charakteristisch. Gelatineplattenkultur: Nach 2—3 Tagen, bei Zimmertemperatur, sind rundliche, körnige Tiefenkolonien mit fast stets seitlichen hyphenähnlichen Ausläufern entwickelt; das Ausläuferwachstum kann auch sehr schwach ausfallen. Die Oberflächenkolonien vergrößern sich schnell, verflüssigen napfförmig die Gelatine; außerhalb des Verflüssigungsnapfes, peripher wird ein Strahlenkranz gebildet. Agarstrichkultur: Nach 40 Stunden ist die Kolonie dick, grauweißlich, glasig matt glänzend, mehr oder weniger häutig. Eine ältere Kolonie wird bräunlich. Möhrenkultur: Die Möhrenscheibe wird nach 5—8 Tagen von einer dünnen, weißlichen, glänzenden Kolonie bedeckt. Alkalibildung findet in Nährlösung III statt. Diastasebildung ist in Nährlösung III und Vα kaum nachweisbar. Die Gelatine wird verflüssigt.

6. Bacillus mycoides.

Spore. Sporengröße: 0,83 μ breit, 1,4—2,2 μ lang. Sporenform: Fig. 58. Sporangienmembranen bleiben lange erhalten; diese sowohl wie auch die Sporenmembranen werden nach Durchfärbung mit Fuchsin gut sichtbar; ohne Reagentien ist die Sporenmembran nicht zu erkennen; Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Relativ starke Anschwellung der Sporen vor der Keimung; letztere erfolgt polar (Fig. 60). Charakteristisch ist die Erscheinung, daß bei der Keimung an den Sporenmembranen meistens noch die Sporangienmembranen (Fig. 59) festhaften. Die Keimstäbchen werden bis 4-lang, seltener länger; ihre Breite beträgt 1,11 μ. Mit Methylenblau 1:40 schwach durchfärbt, erscheinen die Keimstäbchen fast vollständig homogen, also vakuolenfrei. Auf Agar sind nach ungefähr 17 Stunden meistens ein-

und sechsstäbige Zellfäden vorhanden, deren Stäbe meistens 1- bis 10-, doch auch noch mehrzellig sind (Chlorzinkjod), doch es kommen auch Einzel- und Doppelstäbchen und 10- bis 20-stäbige Zellfäden vor, deren Stäbe 2- bis 4-zellig sind. Die Stäbchen sind an den Polen meistens fast gerade abgeschnitten, „eckig“, noch vollständig homogen und 1,39 μ breit. Langsame Eigenbewegung der Stäbchen kann stattfinden. Die Geißelfärbung ist schwer ausführbar. Die Begeißelung ist peritrich. Die Länge der Stäbe nimmt zu, so daß nach ungefähr 40 Stunden mehrstäbige Zellfäden vorhanden sind, deren Stäbe zum Teil Fetttröpfchen gespeichert haben und 50- und mehrzellig sind; im oberen Teile der Kolonie sind schon wenige Sporangien ausgebildet. Nach 64 Stunden auf Agar bei 28° sind im oberen Teile der Kolonie auf der Agarfläche fast nur Sporangien vorhanden, welche meist zu Zellfäden vereinigt sind, die ein-, seltener bis achtstäbig sind und deren Stäbe aus 2, 4, bis 20 einlangen Sporangien bestehen. Nach mehreren Tagen beginnen die Sporangien anzuschwellen, sich abzurunden und vielstäbige Zellfäden mit aus einem Sporangium bestehenden Stäbchen und Einzel- und Doppelsporangien auszubilden. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen III, I und 0 = 3—4, und V, Vα, Vβ, Vγ, Vδ, VI, VII, X = 0—1 ist charakteristisch. Gelatineplattenkultur: In Gelatineplatten entstehen weiße Trübungen, in denen feine weiße Fäden von unregelmäßigem, wirrem, verästeltem Verlaufe hervortreten. Die jungen Kolonien sehen aus wie junge Pilzmyzelien. Nach mehreren Tagen ist die ganze Gelatineplatte von einer fest zusammenhängenden Haut bedeckt. Gelatinestichkultur: Im Gelatinestich findet man nach einigen Tagen längs des Stichs feinste Härchen in dichter Reihe in die Gelatine vordringen. Agarstrichkultur: Auf Agar bei 28° wächst der Bazillus ebenfalls in Gestalt eines schnell sich ausbreitenden, wurzelartigen (myzelartigen) Geflechts. Nach mehreren Tagen bei 28° sind Fäden in den Agar hineingewachsen. Möhrenkultur: Bac. mycoides wächst auf der Möhre schlecht. Nach Wochen ist ein trockener, körniger, dicker Belag entwickelt, welcher aus meistens abgestorbenen Stäbchen besteht. Alkalibildung findet in Nährlösung III statt. Diastasebildung ist in Nährlösung III nicht vorhanden, in Nährlösung Vα, welche 4 Wochen bei 28° und 6 Wochen bei Zimmertemperatur gestanden hatte, war schwache Diastasebildung nachweisbar. Gasbildung findet nicht statt. Die Gelatine wird meistens relativ langsam verflüssigt.

7. Bacillus subtilis.

Spore. Sporengröße: 0,83—0,94 μ breit, 1,7—1,9 μ lang, Sporenform: charakteristischerweise länglich (Fig. 61) wie die 4 vorderen Bilder, seltener wie die 3 letzten. Die Sporenmembran, welche an den Polen der Sporen dicker ist als an deren Längsseiten, wird gut nach Färbung mit Methylenblau- oder Fuchsinlösung sichtbar; Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Die Sporen halten ein $^1/_2$-bis 1-stündiges Kochen aus; sie schwellen vor der Keimung nur sehr wenig an. Die Keimung erfolgt: 1. seitlich unter Keimung mit Kurzstäben (Fig. 62); 2. seitlich unter Keimung mit längeren, kommaförmig gekrümmten Stäbchen; 3. durch äquatoriales, ringförmiges Aufreißen der Sporenmembran unter Streckung des Keimstäbchens (Fig. 63). Die Keimstäbchen werden 1- bis 2-lang, 0,83 μ breit und beginnen bald zu schwärmen. Auf Agar, nach ungefähr 15—20 Stunden bei 28°,

findet man homogene Einzel- und Doppelschwärmer, welche 1- bis 2-lang und 0,83—0,94 μ breit sind. An den nach LÖFFLER gefärbten Schwärmern erkennt man peritriche Begeißelung. Nach 40 Stunden sind auf der Agarfläche Ruhestäbchen und wenige Sporangien, nach 3—4 Tagen vorherrschend Einzel- und Doppelsporangien mit end- und mittelständigen Sporen entwickelt. In Heuabkochung findet nach ungefähr 15—20 Stunden bei 28° Kahmhautbildung und in den die Kahmhaut bildenden Ruhestäbchen starke Glykogenspeicherung statt. In Nährlösung X wird nach 2—4 Tagen stets eine Kahmhaut entwickelt. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen: X und II = 3—4; III und IV = 0—1 ist charakteristisch. Die Agarstrichkultur sieht nach 15—24 Stunden bei 28° grauweißlich, rauh, dünn, häutig aus. Die Möhrenkultur war nach 15 Tagen entweder weißlich, runzlig, stark leistenförmig (Bac. subtilis) oder schmutzigbräunlich, homogen glatt (Bac. subtilis a). Diastase- und Alkalibildung sind in Nährlösung X vorhanden. Nitritbildung findet in Nährlösung VII und II + 0,4 Proz. Kaliumnitrat statt. Die Gelatine wird verflüssigt.

8. Bacillus pumilus.

Spore. Sporengröße: 0,55 μ breit, 0,94—1,52 μ lang. Sporenform: charakteristischerweise stäbchenförmig (Fig. 64, vordere 2 Sporen), seltener wie Fig. 64, letzte 2 Sporen. Ohne Anwendung eines Reagenses ist die Sporenmembran nicht sichtbar; erst nach Durchfärbung der Sporen mit Fuchsin ist dieselbe deutlich erkennbar; Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Die Sporen schwellen vor der Keimung nur wenig an. Die Keimung erfolgt polar (Fig. 65). Die Keimstäbchen werden 1- bis 2-lang und 0,55 μ breit; sie schwärmen sofort. Auf Agar, nach 24 Stunden, sind meistens lebhaft schwärmende Einzel- und Doppelstäbchen entwickelt, welche 0,6 (Bac. pumilus a) bis 0,77 μ (Bac. pumilus) breit sind. Nach 2—4 Tagen findet man Ruhestäbchen und Schwärmer. Die Schwärmer sind stark aerotaktisch und haben peritriche Begeißelung. Nach 4—5 Tagen sind Sporangien vorhanden; sie sind stäbchenförmig, wie auch schwach abgerundet. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen: II = 3—4, IV = 1—2 und V = 0—1, VI, VII, VIII, IX, X = 0 ist charakteristisch. Die Agarstrichkultur ist nach 24 Stunden schwach, dünn, glänzend, glasig, entwickelt; nach 4 Tagen ist sie weißlich, homogen glänzend. Altes Sporenmaterial ist gelblich, stark glänzend. Die Möhrenkultur wird dünn, gelblich, entweder glatt oder schwach runzlig, nach mehreren Wochen grau, nicht schleimig. In Heuabkochung findet starke Entwicklung, Kahmhaut- und schwache Glykogenbildung statt. In Nährlösung IV werden charakteristischerweise eine Kahmhaut und flüchtige Ammoniumbasen entwickelt; Alkalibildung ist also in Nährlösung IV vorhanden. Diastasebildung findet nicht statt. Die Gelatine wird stets langsam verflüssigt.

9. Bacillus simplex.

Spore. Sporengröße: 0,83 μ breit, 1,39—1,7, selten bis 2,2 μ lang. Sporenform: Fig. 66, seltener wie Fig. 67. Sporenmembran ohne Reagens nicht sichtbar; durch Methylenblau-Sudan oder Fuchsin wird die Sporenmembran gefärbt. Exine und Intine sind nicht unter-

scheidbar. Relativ starke Anschwellung der Sporen vor der Keimung. Die Sporen keimen bipolar (Fig. 68), polar und seitlich. Die Keimstäbchen werden bis 3-, seltener mehrlang und 0,94 μ breit. Auf Agar entwickeln sich nach ungefähr 9 Stunden bei 28° viele 12-stäbige Zellfäden, deren Stäbe meistens 2- bis 3-lang sind, und viele 50- und mehr-lange Zellfäden, die auch mit Chlorzinkjod meist keine Septierung zeigen. Nach 12 Stunden sind meist lebhaft schwärmende Einzel- und Doppelstäbchen zu finden. Nach 16—18 Stunden findet man lebhafte Schwärmer und Ruhestäbchen von wechselnder Länge. Besonders charakteristisch sind die kurzen einlangen Schwärmer. Nach 12—24 Stunden findet man viele lebhafte Schwärmer; dieselben besitzen peritriche Begeißelung. Die Stäbchen sind 1—1,11 μ breit. Nach 24—36 Stunden haben die Stäbchen viel Glykogen gespeichert. Nach 2—3 Tagen sind viele Stäbchen angeschwollen, mehr oder weniger abgerundet, und es sind Sporangien entwickelt; die charakteristischsten und häufig vorkommenden Formen der letzteren sind etwas angeschwollen und abgerundet, wie Fig. 69; doch findet man auch häufig stäbchenförmige Sporangien. In Nährlösung V wird eine Kahmhaut entwickelt, welche aus 50-, 60- und mehrstäbigen Zellfäden besteht. Die Entwicklung in Nährlösung X geht sehr langsam und nur nach Impfen mit Stäbchenmaterial von statten; nach 3—5 Tagen ist noch keine Kahmhaut entwickelt; nach einigen Wochen ist die Lösung stark getrübt, jedoch von unveränderter Farbe. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen I, V, X = 3—4; III, IV, Vβ, VII = 0—1 ist charakteristisch. Agarstrichkultur. Nach 24 Stunden bei 28° sind erst tröpfchenförmige Kolonien entwickelt; nach 2 Tagen ist die Kolonie gleichmäßig häutig, fein runzlig, faltig. Möhrenkultur. Nach 3 Tagen ist eine dicke, glasig-durchsichtige, gekröseartig oder schlangenartig gewundene Kolonie entwickelt, nach 7 Tagen ist dieselbe porzellanartig-weißlich. Alkalibildung findet in Nährlösung X statt. Diastasebildung hat in Nährlösung X und V nicht stattgefunden. Die Gelatine wird verflüssigt.

10. Bacillus cohaerens.

Spore. Sporengröße: 0,83—1 μ breit, 1,7—2,2 μ lang. Sporenform: normal (Fig. 70). Die Sporenmembran ist meistens ohne Reagens kaum sichtbar; mit Jod wird dieselbe gelblich und mit Fuchsin rot gefärbt. Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Die Sporen schwellen vor der Keimung meistens stark an (Fig. 71). Die Keimung erfolgt vorherrschend polar (Fig. 72), dann bipolar, seltener seitlich. Die Keimstäbchen können bis 4-lang werden; sie sind 1,11 μ breit. Auf Agar, bei 28° 5—6 Stunden lang, danach 14 Stunden bei Zimmertemperatur von ungefähr 15° entwickeln sich 20-, 50-, 100- und mehrlange Zellfäden, welche meistens septiert sind (Chlorzinkjod). Nach 12 Stunden bei 28° sind meistens 2-, 3- bis 12-stäbige Zellfäden, nach 15—18 Stunden Einzel-, Doppelstäbchen und bis 6- und seltener mehrstäbige Zellfäden entwickelt, deren Stäbe viel Glykogen gespeichert haben (Jodreaktion). Nach 40 Stunden sind 1- und 2-lange Stäbchen, viele schmäler, viele dicker als die Keimstäbchen, vorhanden. An den nach LÖFFLER gefärbten Bakterien erkennt man peritriche Begeißelung Der Schwärmzustand tritt auf Agar, wie in den Nährlösungen unregelmäßig ein. Nach 3—4 Tagen bei 28° sind Sporen entwickelt; dieselben werden normalerweise mittel-, seltener endständig ausgebildet.

Normale Sporangien (Fig. 73). Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen I, II = 3 und III, VI, VII = 0 bis 1 ist charakteristisch. Agarstrichkultur, Nach 1—2 Tagen bei 28° oder noch besser nach 6 Stunden bei 28° und 2 Tagen bei Zimmertemperatur ist eine dicke, mehr oder weniger häutige, schleimige, faltige Kolonie entwickelt. Möhrenkultur. Nach 1—2 Wochen ist eine dicke, glasige, homogene Kolonie entwickelt, welche später mehr oder weniger faltig wird. Alkalibildung findet in Nährlösung I und Vβ statt. Diastasebildung ist in Nährlösung I und Vβ nicht vorhanden. Die Gelatine wird langsam verflüssigt.

11. Bacillus fusiformis.

Spore. Sporengröße: 1,3—1,8 μ im Durchmesser. Sporenform: rund (Fig. 74). Die reifen Sporen sind meistens noch von der Sporangienmembran umgeben (Fig. 75). Die Sporenmembran wird erst mit Hilfe von Fuchsin- oder Jodlösung gut sichtbar; Exine und Intine sind nicht zu unterscheiden. Vor der Keimung schwellen die Sporen stark an; sie keimen auf Agar nach 7—8 Stunden. Die Keimung erfolgt polar (Fig. 76). Die Keimstäbchen werden 1—1,2 μ breit; bald nach der Keimung beginnen die Stäbchen sehr lebhaft zu schwärmen. Auf Agar, nach 15—20 Stunden, findet man vorherrschend Einzel- und Doppelschwärmer, seltener etwas bauchig angeschwollene, vor der Sporenbildung befindliche Stäbchen. An den nach LÖFFLER gefärbten Schwärmern erkennt man peritriche Begeißelung. Nach 1—2 Tagen sind auf der Agarfläche vorherrschend Sporangien entwickelt. Dieselben sind sehr charakteristisch; ihre Form entspricht der Fig. 77. Im Kondenswasser findet man nach 6 Tagen und länger noch viele lebhafte Schwärmer. Weder Glykogen noch Fett waren nachweisbar. Die Intensität des Wuchses in den Nährlösungen: 0, I, II = 3; V, Vα, Vβ, Vγ, X = 0 ist charakteristisch. Agarstrichkultur. Die Kolonie ist nach 1 Tage glasig, glänzend, homogen. nicht häutig und verändert ihr Aussehen auch in den nächsten Tagen fast nicht. Möhrenkultur. Es findet nur sehr schlechte Entwicklung statt; nach ungefähr 12 Tagen entwickelte sich eine ganz dünne, wässerige, graue Kolonie. Alkalibildung ist in Nährlösung 0, I, II, III vorhanden. Diastasebildung (in Nährlösung I und II) ist nicht vorhanden. Die Gelatine wird langsam verflüssigt.

Bacillus Carotarum Koch.

Ueber diese Spezies siehe: GOTTHEIL, ferner KOCH (Bot. Zeitung 1888, No. 18). Er steht dem Bac. cohaerens und simplex sehr nahe.

Kapitel XXI.

Die anaeroben Bakterien.

A. Allgemeines über Anaerobiose.

Litteratur.

Beijerinck, M. W.*, Ueber die Butylalkoholgärung und das Butylferment; Verhandelingen der Koninklijken Akademie van Wetenschappen te Amsterdam, 1893, 2. Sectie, Deel 1, No. 10.* — ***Flügge****, Die Mikroorganismen, 1896, 3. Aufl., I. Teil,*

Vogl in Leipzig. — ***Liborius,*** *Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien; Zeitschr. f. Hygiene 1886, Bd. I, S. 113.* — ***Pfeffer,*** *Pflanzenphysiologie, Bd. I, Leipzig 1897, Wilhelm Engelmann.* — ***Matzuschita,*** *Zur Physiologie der Sporenbildung der Bazillen, nebst Bemerkungen zum Wachstum einiger Anaeroben; Dissertation, Halle 1902.*

Wenn man unter Atmung den Stoffwechsel versteht, welcher die Betriebsenergie für die Organismen zu liefern bestimmt ist, so können wir folgende Arten der Atmung unterscheiden:

1. Sauerstoffatmung. a) Kohlenstoff - Sauerstoff - Atmung, die normale Atmung, welche den meisten Pflanzen eigen ist. b) Schwefelwasserstoff-Sauerstoff-Atmung, welche bei den Schwefelbakterien vorkommt. c) Eisenoxydul-Sauerstoff-Atmung, bei den Eisenbakterien vorkommend. **2. Intramolekulare Atmung,** bei welcher die Betriebsenergie durch Spaltung von energiereichen Verbindungen in eine Summe energieärmerer gewonnen wird.

Im allgemeinen scheint nun jede Zelle fähig zu sein, Betriebsenergie auf kurze Zeit durch intramolekulare Atmung zu gewinnen, wenn ihr Sauerstoff nicht zur Verfügung steht, wie es eben so sicher ist, daß freier Sauerstoff von jeder Zelle, selbst von den Zellen obligat anaerober Organismen sofort in den Betriebsstoffwechsel hineingerissen wird, wenn er der Zelle geboten wird.

Dennoch sind die verschiedenen Organismen, speziell unsere Bakterien und Pilze, dann, wenn sie normal und fortgesetzt wachsen, wenn sie sich vermehren, überhaupt ihren ganzen Entwicklungsgang durchlaufen sollen, auf eine bestimmte Sauerstoffzufuhr angewiesen. Von diesem Gesichtspunkt aus hat zuerst PASTEUR (Compt. rend. LII, p. 340 und 1260, LVI, LVII, LXXX) welcher entdeckte, daß Leben ohne Sauerstoff möglich sei, die Bakterien in Anaeroben und Aeroben eingeteilt. LIBORIUS (Z. f. Hyg. I, 115) unterschied dann 1. obligate Anaeroben, 2. fakultative Anaeroben, 3. obligate Aeroben unter den Bakterien.

Unter obligaten Anaeroben versteht man danach solche Bakterien, „welche für alle ihre Lebensfunktionen auf die Abwesenheit von Sauerstoff angewiesen sind" (LIBORIUS, 1886, S. 169).

Es gibt in der That Bakterien, welche sich fortgesetzt vermehren können und Sporen bilden, wenn ihnen jede Spur von Sauerstoff entzogen wird. BEIJERINCK's Granulobacter butylicum vermehrte sich fortgesetzt in einer Nährlösung, der indigschwefelsaures Natrium und mehr Natriumhydrosulfit, als zur Weißerhaltung des Farbstoffes nötig war, zugesetzt worden war, so daß keine Spur freier Sauerstoff vorhanden sein konnte (BEIJERINCK, 1893, S. 33). Jedoch verträgt auch dieser Bazillus sehr geringe Sauerstoffmengen, ohne abzusterben; seine Schwärmoidien bewegen sich sogar bei Vorhandensein geringster Spuren von Sauerstoff, jedoch findet bei Vorhandensein der geringsten Sauerstoffmengen keine Sporenbildung statt (BEIJERINCK, 1893, S. 19).

Aber selbst der Granulobacter BEIJERINCK's vermag bei geringer Zufuhr von Sauerstoff zu leben und sich zu vermehren, er ist also nicht absolut obligat anaerob. Zwischen dieser Kategorie und der nächsten der der fakulativen Anaeroben gibt es überhaupt alle Uebergänge, vorzüglich wenn wir den Begriff der fakultativen Anaeroben mit den Bakteriologen etwas weiter fassen, als es LIBORIUS gethan hat.

Eine solche Art von Uebergangsform bildet z. B. anscheinend der Rauschbrandbazillus, der nach KITT manchmal in Kulturen in

1 Liter Bouillon bei voller Zufuhr von Luft wuchs (C. f. B. 1895, Bd., XVII. 1. Abt., S. 168). Freilich könnte dabei auch der Sauerstoff durch energische Gasbildung ausgetrieben worden sein. Als Uebergänge können auch die Formen gelten, welche bei Sauerstoffabschluß am besten gedeihen, doch aber bei Luftzutritt noch gut wachsen (z. B. die termophilen Bakterien von RABINOWITSCH bei 37°).

Ueber die fakultativen Anaeroben sagt LIBORIUS: „Diese Bakterien sind für gewöhnlich auf Zufuhr von Sauerstoff angewiesen; alle ihre Lebensäußerungen gehen am kräftigsten von statten, wenn sie mit reichlichen Sauerstoffmengen in Berührung sind, und eine Beschränkung der letzteren führt ersichtlich zu einer Verlangsamung des Wachstums. Sie sind aber andrerseits nicht so empfindlich gegen Sauerstoffmangel, daß sie ihre Lebensäußerungen dann etwa völlig einstellen, sondern sie pflegen je nach der Vollständigkeit der Sauerstoffentziehung, immerhin noch eine beträchtliche Konsumption des Nährmaterials und eine bedeutende Vermehrung zu leisten.“ Als Beispiele zählt LIBORIUS Bacillus anthracis, Spirillum cholerae asiaticae etc. auf. Dieser Begriff ist später erweitert worden, so daß z. B. GOTSCHLICH (FLÜGGE 1896, S. 127) sagt: „Uebrigens gibt es auch umgekehrt fakultative Anaeroben, die bei Sauerstoffabschluß besser gedeihen als bei Luftzutritt“. Bei den Anaeroben hängt es sogar manchmal von den von außen zugeführten Kräften ab, ob eine Spezies besser mit oder ohne Sauerstoff wächst. So fand RABINOWITSCH, daß ihre termophilen Bakterien bei hoher Temperatur aerob schneller, bei niederer Temperatur aerob langsamer wuchsen, als anaerob. Obligate Anaeroben sind nach LIBORIUS solche, welche für alle ihre Lebensfunktionen auf die Abwesenheit von Sauerstoff angewiesen sind.

Diese Klassifizierung der Bakterien ist für die Bakteriologie praktisch, genügt jedoch nicht für eine genaue Kenntnis der Bakterienspecies. Bezüglich des Verhaltens einer Bakterienspezies zum Sauerstoffe wären vielmehr eine ganze Reihe von Fragen zu beantworten, von denen ich die folgenden hervorheben will.

1. Bei welcher maximalen Konzentration des Sauerstoffs vermag eine Spezies noch die vollständige Entwicklung durchzumachen?

2. Welches ist die optimale Konzentration, bei welcher die Spezies die ganze Entwicklung am kräftigsten durchführt?

3. Bei welcher minimalen Konzentration des Sauerstoffs vermag eine Spezies noch ihre ganze Entwicklung durchzuführen?

4. Wie verhält es sich mit dem Maximum, Optimum und Minimum der Konzentration für das Wachstum und die Vermehrung der Oidien?

5. Welchen Einfluß übt die Sauerstoffkonzentration auf die Sporenbildung und Sporenkeimung der Spezies aus?

6. Welchen Einfluß übt die Temperatur auf die Kardinalpunkte aus?

7. Welchen Einfluß üben die Ernährungsverhältnisse auf die Lage der Kardinalpunkte aus?

8. Wie wirkt ein regelmäßiger Wechsel in der Zufuhr des Sauerstoffs?

9. Wie verhält es sich mit der Gewöhnung der Spezies an verschiedene Sauerstoffkonzentrationen?

10. Wie ändert sich der Stoffwechsel bei den drei Kardinalpunkten?

Eine hierher gehörende Untersuchung hat jetzt MATZUSCHITA (in KLEBS' Laboratorium) ausgeführt. Bacillus butyricus begann erst zu wachsen, als der Sauerstoffgehalt der Luft auf 0,0003 Volumenprozente herabgesetzt worden war und entwickelte sich bei vollständigem Sauerstoffausschluß üppig. In verdünnter Luft von 12,5 mm Druck wuchs der Spaltpilz also noch nicht. Der fakultativ anaerobe Bacillus brevis wuchs bei den verschiedensten Sauerstoffspannungen gleich gut.

Wenden wir nun unseren Blick noch kurz auf die Ernährungsphysiologie der Anaeroben während des anaeroben Lebens. Die anaeroben Bakterien nehmen während des anaeroben Lebens nicht nur die Stoffe aus dem Nährsubstrate auf, welche sie zum Aufbau ihres Körpers brauchen, sondern sie nehmen auch eine große Menge von passenden Stoffen auf, um sie zu zerspalten und so Betriebsenergie aus denselben zu gewinnen. Dabei sind wahrscheinlich für die verschiedenen Bakterienspezies die zur Gewinnung der Betriebsenergie brauchbaren Stoffe nicht immer die gleichen, wie auch der Aufbau von Zellsubstanz nicht allen Spezies mit den gleichen Substanzen gelingt. Manche Spezies gedeihen anaerob mit Pepton allein (Bacillus putrefaciens, coli nach BEIJERINCK, Bot. Zeit. 1891, S. 745. Anmerkung). Für manche Buttersäurebakterien genügen Glyzerin oder Invertzucker oder Mannit, für andere Weinsäure oder Äpfelsäure oder Zitronensäure als einzige organische Nährsubstanz.

Manche anaeroben Organismen sind sehr wählerisch bezüglich der verwendbaren Verbindungen. So können z. B. bestimmte Saccharomycesarten noch nicht einmal alle einfachen Zuckerarten gebrauchen. d-Galactose kann nicht zur intramolekularen Atmung von Saccharomyces apiculatus dienen, wird dagegen von Saccharomyces cerevisiae dazu verwendet (ARMINIUS, C. f. B. 1896. II. Abt., Bd. II, S. 653). Im allgemeinen scheinen fakultative Anaeroben viel wählerischer in den für ihren Betriebsstoffwechsel brauchbaren Substanzen zu sein, wenn sie intramolekular atmen, als wenn sie Sauerstoffatmung durchführen. So können manche Saccharomycesarten die nur bei Gegenwart bestimmter Zuckerarten anaerob leben, aerob auch ohne Zucker und mit sehr verschiedenen Nährstoffen auskommen. Chinasäure und Pepton ernähren zusammen Saccharomyces cerevisiae gut, wenn ihm Sauerstoff zur Verfügung steht, nur kurze Zeit und schlecht bei Sauerstoffmangel (CHUDIAKOW, Landw. Jahrb. 1894, Bd. XXIII, S. 489). Im allgemeinen scheinen die Anaeroben gegen stark alkalische Reaktion der Nährsubstrate weniger empfindlich zu sein als Aeroben. Nach MATZUSCHITA (1902) hört das Wachstum der Anaeroben erst bei 10—15% Sodazusatz zur Nährgelatine auf.

Exkrete, welche bei dem Stoffwechsel der Anaeroben gebildet werden, sind für die verschiedenen Spezies sehr verschieden, auch wenn die Nährstoffe gleich sind, die den Spezies zur Verfügung stehen.

So z. B. erzeugten B. polypiformis und muscoides in den von LIBORIUS angewandten Nährsubstraten kein Gas und kein Ferment, während der Pseudo-Ödembazillus und Clostridium foetidum in den gleichen Nährsubstraten Gasentwickelung hervorriefen und Ferment entwickelten (LIBORIUS, 1886, S. 168).

Es geht aus der Angabe zugleich hervor, daß Anaerobiose mit und ohne Gasbildung vorkommt. Dabei kann wohl eine bestimmte



Spezies unter Umständen, je nach der Art des zur Verfügung stehenden Nährstoffes, bei der Anaerobiose Gas bilden oder nicht.

Von gasförmigen Exkreten kommen bei den Anaeroben vor: 1. Kohlensäure (meist), kann jedoch auch fehlen oder der Menge nach sehr unbedeutend sein (A. Mayer, C. f. B. 1892, Bd. XII, S. 100); 2. Wasserstoff, sehr häufig und in größerer Menge; 3. Stickstoff; 4. Methan; 5. Kohlenoxyd. Von anderen Exkreten sind der Menge nach bei einzelnen Spezies oft besonders hervorragend: Aethylalkohol (Saccharomyces cerevisiae bei Gegenwart von Dextrose), Butylalkohol (Granulobacter butylicum; bis 2 % des angesetzten Mehles; Beijerinck, 1893, S. 37); Milchsäure etc.

B. Allgemeines über die Kulturmethoden für Anaeroben.

Litteratur.

Botkin, *Eine einfache Methode zur Isolierung von anaeroben Bakterien; Zeitschrift für Hygiene 1890, Bd. XCI.* — **Burri,** *Zur Isolierung der Anaeroben; Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. VIII, No. 17, S. 533.* — **Fränkel, Karl,** *Ueber die Kultur anaerober Mikroorganismen; Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde 1888, Bd. III, S. 735.* — **Fränkel, Karl,** *Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebensthätigkeit der Mikroorganismen; Zeitschr. f. Hygiene 1889, Bd. V, S. 332.* — **Gabritschewsky,** *Zur Technik der bakteriologischen Untersuchungen; Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde 1891, Bd. X, S. 248.* — **Günther,** *Einführung in das Studium der Bakteriologie, Leipzig 1898.* — **Hesse,** *Ein neues Verfahren zur Züchtung anaerober Bakterien; Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten 1892, Bd. XI, S. 237.* — **Hueppe,** *Die Methoden der Bakterienforschung, Wiesbaden 1891, S. 323.* — **Kabrhel,** *Zur Frage der Züchtung anaerober Bakterien; Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde 1899, I. Abh., Bd. XXV, S. 555.* — **Lindner,** *Die Adhäsionskultur, eine einfache Methode zur biologischen Analyse von Vegetationsgemischen in natürlichen oder künstlichen Nährsubstraten; Ref. Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. VIII, S. 286.* — **Migula,** *System der Bakterien, Jena 1897, Bd. I.* — **Nikiforoff,** *Ein Beitrag zu den Kulturmethoden der Anaeroben; Zeitschr. f. Hygiene 1890, Bd. VIII, S. 489.* — **Omelianski,** *Ein einfacher Apparat zur Kultur von Anaeroben im Reagensglase, Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., No. 22, S. 711.* — **Pfeffer,** *Pflanzenphysiologie 1897, Bd. I.* — **Schattenfroh und Grasberger,** *Ueber Buttersäuregärung, I. Abhandlung; Archiv f. Hygiene 1900, Bd. XXXVII, S. 54.* — **Turró,** *Zur Anaerobenkultur; Centralbl. f. Bakt. 1902, I. Abt., Bd. XXXI, S. 175, Originale.* — **Weichselbaum,** *Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen; Centralbl. f. Bakt. 1902, I. Abt., Bd. XXXII, S. 401, Originale.*

Sollen Bakterien bei vollständigem Abschluß von Sauerstoff kultiviert werden, so wird man in den extremsten Fällen gut thun, die Kulturmedien selbst zuerst völlig von Sauerstoff zu befreien. Zu dem Zwecke kann man die Nährsubstrate einfach eine Zeit lang zum Sieden erhitzen, besser aber erhitzt man die Nährsubstrate in einem Wasserbade auf 30° bis 42° und verdünnt die Luft über dem Nährsubstrate, bis dasselbe ins Sieden gerät, in dem man es einige Zeit erhält. Auch durch Einleiten von Wasserstoff oder Kohlensäure in die eventuell geschmolzenen Nährsubstrate läßt sich der Sauerstoff aus ihnen austreiben.

Sollen in dem sauerstofffreien Nährsubstrate nun Kulturen angelegt werden, so muß dasselbe in einem sauerstofffreien Raume erhalten werden.

Es ist zuerst darauf zu achten, daß solche Räume wirklich dicht gegen die Außenluft abgeschlossen sind. Ein dauernder Abschluß gegen den Sauerstoff der Außenluft ist durchaus nicht leicht herzustellen. Glasgefäße werden am sichersten durch Zuschmelzen geschlossen. Kautschukstöpsel, welche dick und gut sind, schließen Räume relativ gut ab, vorzüglich wenn sie noch mit geschmolzenem Paraffin überzogen werden. Kautschukschläuche lassen durch ihre Wandung Wasserstoff

ziemlich leicht hindurch und dafür Sauerstoff eintreten. Flüssiges Paraffin schließt anscheinend auch wenig sicher ab (MIGULA, 1897, S. 329). Quecksilber schließt gut ab; da seine Dämpfe für die Zellen giftig sind, so bedeckt man seine Oberfläche am besten mit einer Wasserschicht.

Wichtig ist es, kontinuierlich die Räume, welche sauerstofffrei sind, auf ihren Sauerstoffgehalt zu prüfen. Als Indikator für Sauerstoff sind verschiedene Substanzen benutzt worden. KABRHEL z. B. wandte mit Methylenblau gefärbte Dextrose-Nährgelatine an, die sich in sauerstofffreiem Raume völlig entfärbt. PETRI (C. f. B. 1900, Bd., XXVIII. 1. Abt., S. 196) beschreibt eine Methode der Benutzung von Pyrogallol mit Kaliumhydroxyd als Indikator. Der PETRI'sche Apparat, den Altmann für diese Methode verkauft, ist unbrauchbar, weil die Innenschale zu klein ist.

Zur Entfernung der Luft aus den Kulturgefäßen hat man sich verschiedener Methoden bedient, die ich hier zuerst kurz anführe.

1. Auspumpen der Luft, bei gewöhnlicher Temperatur, aus dem Kulturgefäße.

2. Auskochen der Nährsubstrate und Gefäße bei gewöhnlichem Luftdrucke.

3. Verdrängen des Sauerstoffs durch Wasserdampf, indem man das Kulturgefäß mit dem Nährsubstrate auf 30°—40° erhitzt und die Luft in demselben mittelst der Luftpumpe möglichst verdünnt, so daß die Nährsubstrate kräftig sieden.

4. Verdrängen des Sauerstoffs durch indifferente Gase.

5. Absorption des Sauerstoffs durch verschiedene Mittel, z. B. Natriumhydrosulfit (SO^2 Na^2, von GRÜBLER zu beziehen), Ferrosulfat und Natronlauge, Mangansulfat und Natronlauge, Ferrosulfat und Ferrocyankalium (GUNNING, Journ. f. prakt. Chemie, 1879 N. F., Bd. XX. S. 434), alkalisches Pyrogallol. Auch sauerstoffbedürftige Mikroorganismen neben etwas Natronlauge, so z. B. Saccharomyces Mycoderma in Malzwürzegelatine mit Dextrose oder auch Saccharomyces crevisiae, werden zur Sauerstoffabsorption benutzt.

6. Gleichzeitige Benutzung verschiedener dieser Methoden.

Auf den angegebenen Prinzipien beruhen alle in der Litteratur beschriebenen Kulturmethoden, für welche eine ganze Reihe von Apparaten ersonnen worden ist. Ich gebe in dem folgenden eine kurze Uebersicht über die wichtigsten dieser Methoden.

1. Auspumpen der Luft. PASTEUR, JOUBERT und CHAMBERLAND (Compt. rend. 1878) benutzten Apparate, aus denen die Luft durch Auspumpen entfernt wurde. ZUPNIK (C. f. B. 1898, Bd., XXIV. 1. Abt., S. 267) benutzt die Toricelli'sche Leere als Vakuum. KLEIN (C. f. B. 1898, Bd. XXIV, S. 967) benutzt eine auf geschliffener Glasplatte aufgesetzte, mit Wachs und Talg gedichtete Glocke, pumpt diese aus und läßt den Sauerstoff weiter durch Pyrogallol absorbieren. Oben ist die Glocke mittelst eines Schlauches geschlossen.

2. Auskochen des Nährsubstrates und Abschluß des Sauerstoffs durch Ueberschichten. HESSE (Deutsche mediz. Wochenschrift 1885, Nr. 14) und LIBORIUS (Z. f. Hyg. I, 1) kochen Nährgelatine oder den Nähragar in Höhenschichten von 15—20 cm im Reagensglase, lassen auf 25° (resp. 40°) erkalten, impfen das Nährsubstrat und lassen erstarren. HIBLER (C. f. B. 1899, Bd. XXV. 1. Abt., S. 524) giebt eine Methode zur Reinkultur in Gelatineröhrchen mit hoher Schicht an. Er entnimmt die Kolonien mit einer Glaspipette.

WEICHSELBAUM (1902) läßt selbst flüssige Nährsubstrate mit Agar überschichten. HÜFNER, ROSENBACH, LIBORIUS (HUEPPE, 1891, S. 364) haben Apparate für die Entfernung der Luft durch Auskochen, welche mit „Infektionsfortsätzen" versehen sind, angegeben. NIKIFOROFF (1890, S. 489) benutzt Glasröhrchen, welche ganz mit durch Auskochen vom Sauerstoff befreiter Nährlösung gefüllt sind, impft und schmilzt die Glasröhrchen darauf zu.

BURRI (1902) kultiviert in mit Agar gefüllten Glasröhren, die er beiderseits wie Gummistopfen verschließt und zerschneidet dann die Agarzylinder in Scheiben.

3. Austreiben der Luft durch Wasserdampf. FITZ (1884) benutzte schon, ähnlich wie GRUBER, Kolben zur Kultur, aus denen er die Luft durch Wasserdampf bei niederem Drucke ausgetrieben hatte. GRUBER (C. f. B. 1887, S. 367, siehe auch HUEPPE, 1891, S. 367) erwärmte das Nährsubstrat auf 30 bis 40° in einem oben etwas ausgezogenen, mit Wattebausch, Kautschukstöpsel und Saugrohr versehenen Reagensglase und pumpte die Luft 15 Minuten lang aus, so daß die Flüssigkeit während dieser Zeit im Sieden blieb. Das Reagensglas wurde während des Siedens zuletzt zugeschmolzen. Aehnlich verfährt ROUX (Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 1, No. 2). SCHOTTELIUS (C. f. B. 1887, Bd. II, No. 4) gibt hierher gehörige Kölbchen mit Kappenverschluß an.

4. Verdrängen der Luft durch andere Gase. Hierher gehörige Methoden gaben EXNER, BUCHNER (1885), HAUSER, ROUX (1884, 1888), LIBORIUS (1886) und C. FRÄNKEL (1888, S. 765) zuerst an. Die Autoren benutzen Reagensgläser oder Kölbchen, in denen der Agar (bei 40—42°) und die Gelatine (bei 30—35°) geschmolzen sind und leiten Wasserstoff ein. FRÄNKEL kocht die Gelatine vorher aus, impft, leitet Wasserstoff durch die Röhren und schließt diese dann durch Abschmelzen der in einem Kautschukstöpsel steckenden Gasleitungsröhren. Andere schmelzen die Reagensgläser oder Kölbchen selbst zu. LÖFFLER und FUCHS (1890) leiten in die umgekehrt gehaltenen Reagensgläser Wasserstoff ein und schließen die Gläser mit Kautschukstöpseln, die paraffiniert werden (siehe HUEPPE, S. 361). HESSE (Z. f. H., 1892, Bd. XI, S. 237) stellt die Reagensgläser beim Einleiten des Wasserstoffs und später auf Quecksilber, welches sich in einem kleinen Porzellantiegel befindet. HEIM (C. f. B. 1892, Bd. XI, S. 800) und OGATA (C. f. B. 1892, Bd. XI, S. 621) arbeiten mit oben ausgezogenen Reagensgläsern und leiten den Wasserstoff durch eine Kapillare ein.

Gefäße, die zu Plattenkulturen geeignet sind, eventuell zur Verwendung gewöhnlicher Petrischalen, sind mehrfach beschrieben worden. BLÜCHER (1890) verwendet eine Glasglocke, welche er durch Glyzerin abschließt, BOTKIN (1890) gebrauchte Paraffinum liquidum zum Abschluß eines solchen Gefäßes, WEICHSELBAUM (1902) schließt sich an BOTKIN an und verwendet käuflichen Wasserstoff, den er aus der Bombe erst über glühende Kupferspiralen leitet, um den Sauerstoff zu entfernen, und zugleich Pyrogallol. Hierher gehört auch das Verfahren von SCHATTENFROH und GRASBERGER (1900); sie reinigen den Wasserstoff, der im KIPP'schen Apparate entwickelt wird mit Bleinitrat, Kaliumchromat + Schwefelsäure, Silbernitrat, Kaliumpermanganat + Schwefelsäure, Pyrogallol und benutzen die BOTKIN'sche Glocke mit Paraffinum liquidum als Abschluß. BULLOCH (C. f. B., Bd. XXVII, S. 140) dichtet die auf eine Glasplatte aufgeschliffene Glocke mit Unguentum resinae

uud leitet Kohlensäure oder Wasserstoff ein, den Rest des Sauerstoffs durch Pyrogallol absorbierend. NOVY verwendet auch ein exsikkatorähnliches Gefäß mit eingeschliffenen Glasstopfen und Wachs-Olivenöl-Dichtung (C. f. B. 1893, S. 581), ebenso LUBINSKI, dessen kompliziertes Gefäß mittelst Vaseline und Wachs gedichtet wird (C. f. B. 1894, Bd. XVI, S. 20). HESSE setzt eine Glasglocke auf Quecksilber auf, leitet durch Röhrchen Wasserstoff ein und benutzt zugleich Pyrogallol (HESSE, 1892). Eine durch Kautschukschläuche zu schließende Flasche benutzt NICOLAIER (C. f. B. 1894, S. 227). MIGULA (C. f. B., 1896, Bd. XIX, S. 894) wendet eine Glasglocke mit oberem Tubus, die er durch flüssiges Paraffin abschließt, KABRHEL (1899) wieder eine auf eine Glasglocke aufgeschliffene, mit einem Gemische von 2 Teilen Fett und 1 Teil Rindstalg gedichtete Glasglocke an. Apparate, welche einzelnen Petrischalen entsprechen oder zur Beherbergung nur einer Schale dienen sollen, sind ebenfalls mehrfach beschrieben. ZETTNOW (C. f. B. 1894, Bd. XV, S. 638) schildert einen mit Mennigekitt gedichteten Apparat für eine Petrischale, der wohl nur in der Hand ZETTNOW's etwas leisten kann. Flache Schälchen beschreiben KITASATO (1889), KAMEN (1892) und ROTH (C. f. B., 1893, Bd. XIII, S. 223), der die Zuleitungsröhre mit geschmolzenem Paraffin dichten läßt, BECK (C. f. B. 1897, Bd. XXII, S. 343), der seine Doppelschalen ganz mit geschmolzenem Paraffin dichtet, für Kulturen in Wasserstoff. GABRITSCHEWSKY (1891) benutzt komplizierte, aber zweckmäßige Schalen für Wasserstoff und Pyrogallol mit Vaselinedichtung.

Eine Methode für Objektträgerkulturen in Wasserstoff beschreibt MIGULA (1897, S. 330).

LINDNER (1902) läßt zur Beobachtung der Entwickelung von anaeroben Bakterien unter dem Mikroskope eine feine Schicht der infizierten Nährlösung zwischen zwei absolut reine Deckgläschen bringen und mit Vaseline seitlich verschließen.

Als „indifferentes“ Gas zum Verdrängen des Sauerstoffes wurde fast allgemein Wasserstoff benutzt. In reinem Wasserstoffe lassen sich in der That wohl die meisten Bakterien kultivieren. Allerdings hat VAN SENUS (Dissertation, Leiden 1890) eine Beobachtung über die schädigende Einwirkung von Wasserstoff auf die Bakterien gemacht.

Kohlensäure ist für manche obligat anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien schädlich (FRÄNKEL, 1889, S. 354), so z. B. für den obligat anaeroben Rauschbrandbazillus und den Bazillus des malignen Ödems, doch wachsen einige Bakterien sehr gut in Kohlensäureatmosphäre, so PASTEUR's Vibrio septique (PASTEUR, JOUBERT et CHAMBERLAND, Compt. rend. 1878, p. 1038), ferner der Bazillus des Typhus abdominalis, der FRIEDLÄNDER'sche Pneumococcus etc. (FRÄNKEL, S. 341).

FERRAN (C. f. B. 1898, Bd. XXVI, I. Abt., S. 29) empfiehlt Azetylengas zur Vertreibung des Sauerstoffs, ohne Angaben über den Erfolg seiner Kulturen. Die allgemeine Brauchbarkeit dieses Gases ist zu bezweifeln, da NELJUBOW (Beihefte z. Botan. Centralbl. 1901, Bd. X, Heft 3) fand, daß meist schon in einem Gemische von 2 ccm Azetylen auf 8 Liter Luft Keimlinge der höheren Pflanzen starben.

5. Absorption des Sauerstoffs der Luft. NENCKI benutzte wohl zuerst alkalische Pyrogallollösung zur Absorption des Sauerstoffs bei der Anaerobenkultur (Ueber die Lebensfähigkeit der Spaltpilze bei fehlendem Sauerstoff, 1880). BUCHNER (Z. f. physiol. Chemie 1885;

C. f. B. 1881, No. 5) stellt kleine Reagensgläser in größere mit alkalischer Pyrogallussäurelösung und schließt die größeren Röhren mit Kautschukstöpseln. BRAATZ und auch NIKIFOROFF (Z. f. Hyg., Bd. VIII, S. 489) benutzen Pyrogallol bei der Züchtung von Anaeroben im hängenden Tropfen. TURRO (1902) gibt neue Gefäße für diese Methode an, die nichts prinzipiell neues bieten. OMELIANSKI (1902) beschreibt einen praktischen Apparat für ein einzelnes Reagensglas. Zur Absorption benutzt er ein Gemisch von gleichen Volumen einer 12,5proz. Kalilauge und einer 5proz. Pyrogallollösung. Es entwickelt dieses Gemisch Spuren von CO, absorbiert aber schnell. Die langsamer absorbierende Mischung von 1 Vol. 25proz. Pyrogallollösung und 6 Vol. 60-proz. Kalilauge entwickelt kein CO.

Hierher gehört auch der von verschiedenen Seiten empfohlene Zusatz reduzierender Substanzen zu den für Anaeroben bestimmten Kulturmedien. KITASATO und WEYL (Z. f. Hyg., Bd. VIII, S. 4) empfehlen einen Zusatz von 0,3 bis 0,5 Proz. ameisensaurem Natron als Zusatz zu den Nährsubstraten. TRENKMANN (C. f. B., Bd. XXIII, S. 1041) benutzt mit Schwefelnatrium versetzte Nährböden zur Anaerobenkultur in offenen Reagensgläsern. Er fügt zu 20 ccm Nährgelatine (ohne Dextrose) 2 Tropfen einer 10-proz. Schwefelnatriumlösung. Von allgemeinem Interesse für die Kultur von Anaeroben sind auch die Methoden der Anreicherung von Mischkulturen an Anaeroben. BEIJERINCK (C. f. B. 1895, II. Abt., S. 105) benutzt dazu Gärkölbchen mit dünn ausgezogenem, zurückgebogenem oberen Ende.

Aus der Zahl und Mannigfaltigkeit der Vorschriften für die Anaerobenkultur geht schon hervor, daß diese Schwierigkeiten macht. Sie finden ihren Grund wohl in erster Linie in der Verschiedenheit der Biologie der verschiedenen Spezies, vorzüglich in der Verschiedenheit der Ansprüche an die Spannung des Sauerstoffs, dann auch in der verschiedenen Empfindlichkeit gegen die zur Anaerobenkultur benutzten Gase. Die Methoden passen deshalb nicht alle für jede Spezies, und es ist besonders zu beachten, daß einzelne Spezies nur nach absoluter Entfernung des Sauerstoffs aus den Kulturgefäßen wachsen können, die man mittelst der gewöhnlichen Verfahren nicht erreicht (Sulfidferment; BEIJERINCK, C. f. Bakt., 1895, II. Abt., Bd. I., S. 109), andere nur bei geringer Konzentration des Sauerstoffs gut gedeihen, manche schließlich bei jeder Sauerstoffspannung gut fortkommen.

Uebung 23.

Die Reinkultur einiger fakultativen und obligaten Anaeroben.

Wir benutzen folgende Apparate:

1. Eine gute Wasserstrahlpumpe aus Glas oder Metall mit Quecksilbermanometer oder richtig zeigendem anderen Manometer. Die Pumpe ist auf ihre Leistungsfähigkeit zu prüfen (siehe Preisliste von ALTMANN, 1902, Abt. II, No. 968, Fig. 968; Preisliste von GREINER & FRIEDRICHS, Wasserluftpumpe No. 626, BENDER und HOBEIN München: Münchner Pumpe).

2. Eine durch ein Wasserstrahlgebläse (z. B. Gebläse No. 972b der Liste von ALTMANN, No. 1129 der Liste von HUGERSHOFF (getriebene Gebläselampe) No. 780 bei ALTMANN).

3. Einschmelzröhren, welche wesentlich gleich den ROUXschen Röhren oder Kartoffelkulturröhren (ALTMANN, Fig. 204), nur länger sind. Sie sind aus leicht schmelzbarem Glase von ungefähr 1 mm Wandstärke hergestellt und haben eine Weite von 1,8 cm, eine Länge von 27,5 cm. 5,5 cm über dem zugeschmolzenen Ende sind sie eingeschnürt. Bei Bestellungen sind die Maße anzugeben.

4. Gut schließende Exsikkatoren mit seitlich eingeschliffenem Glashahne; Höhe 15 cm, lichte Weite 11 cm. Sie werden mit einem Gemische von 2 Teilen Fett und 1 Teil Talg oder 1 Teil Wachs und 3 Teilen Vaseline eingefettet und völlig ausgepumpt, dann 2 Tage beiseite gestellt. Danach verbindet man den geschlossenen Hahn derselben mit der Luftpumpe, läßt dieselbe arbeiten, bis das Manometer festen Stand behält und öffnet den Hahn des Exsikkators, wobei bei einem genügend schließenden Exsikkator kein momentanes Sinken des Manometers eintreten darf.

Um Anaeroben zu fangen, verfahren wir folgendermaßen. Die Kugel von 6 Einschmelzröhren füllen wir zu $^{2}/_{3}$ mit abgekochtem Wasser; zu dem Wasser von 3 Kugeln setzen wir eine Messerspitze von reinem, sterilem Kalziumkarbonat. Eine Porzellanschale von ungefähr 500 ccm Inhalt füllen wir voll Wasser, welches wir zum Sieden erhitzen. Wir schälen eine ungewaschene Möhre und schneiden aus ihr Streifen von 6 cm Länge, 1,5 cm Breite und 0,6 cm Dicke; Schalen und Stücke werfen wir in das siedende Wasser und lassen sie noch 30 Sekunden auf dem Feuer. Wir stecken in jede der 6 Einschmelzröhren je einen Möhrenstreifen und ziehen die Röhren vor dem Gebläse, ungefähr 7 cm unter dem offenen Ende, zu einer dünnen, möglichst dickwandigen, etwa 5 cm langen Verengerung aus.

Dann verschließen wir die Öffnung der Röhre mit einem Kautschukstöpsel mit Glasröhrchen, an dessen Ende wir einen mit der Saugpumpe verbundenen Gummischlauch anschließen. In einem Wasserbade erwärmen wir Wasser auf 30—40°, stellen die Kugel der Einschmelzröhre, welch letztere wir mit dem oberen Ende in ein Stativ einklemmen, senkrecht in das Wasserbad und setzen die Luftpumpe in Gang. Ist das Manometer auf festem Stande, so pumpen wir noch 10 Minuten lang weiter, nehmen dann die Röhre aus dem Wasserbade, schmelzen vor dem Gebläse sofort die Verengerung in der Mitte zu und ziehen das obere Stück des Rohres ab, so daß nun das Rohr luftleer und geschlossen ist.

Die Röhre stellen wir bei 28° beiseite und sehen schon nach 4—5 Tagen Kolonien auf der Möhre. Zuerst treten diejenigen Spezies hervor, welche noch bei etwas höherer Sauerstoffspannung gut gedeihen, vorzüglich wird sich meist der gasbildende, gallertbildende Bacillus asterosporus breit machen. Nach 10—20 Tagen sind stets auch noch andere, teilweise opake Kolonien von obligaten Anaeroben zu sehen. Darunter kommen Sarzinen, Streptokokken, vielleicht auch Formen, welche dem Clostridium Pastorianum WINOGRADSKYS (C. f. B., II. Abt., 1902, S. 43), dem Granulobacter saccharobutyricus von SCHATTENFROH und GRASBERGER (Archiv f. Hygiene, 1900, S. 54), dem Granulobacter saccharobutyricum und lactobutyricum BEIJERINCKS (1893) ähnlich sind und reichlich Glykogen und Iogen speichern. Nach 15—30 Tagen öffnen wir eine oder die andere Röhre, die gute Kolonien zeigt, indem wir sie in ein Tuch einschlagen und ihre Spitze in der Gebläseflamme erweichen. Meist ist ein Ueberdruck in der Röhre vorhanden, so daß

die Gase die Spitze durchbrechen. Wir feilen hierauf die Röhre an einer unausgezogenen Stelle mit der dreikantigen Feile ein wenig an und sprengen mit glühender Sprengkohle (Carbo nitratus, von E. MERCK bezogen) die Röhre ringsherum gerade ab. Nun nehmen wir mit der Platinnadel von jeder Kolonie eine Spur hinweg und untersuchen sie in einer Spur Jodjodkaliumlösung mit dem Mikroskope. Viele Kolonien werden aus Bac. asterosporus bestehen. Diese lassen wir unbeachtet. Wir suchen uns einige andere Kolonien, am besten solche, welche Sporen zeigen, zur Reinzucht der sie bildenden Spezies aus. Mit jeder dieser Spezies legen wir in folgender Weise anaerobe Plattenkulturen an.

Wir sterilisieren uns im Autoklaven ein Gemisch von 50 g Kalziumkarbonat mit 150 g Wasser.

Wir schmelzen sechs Röhrchen mit Heydenagar (oder D-Agar), erhitzen letzteren einige Minuten zum Kochen und stellen die Röhrchen dann in ein Wasserbad von 40°, bis sie auf diese Temperatur abgekühlt sind. Drei der Röhrchen versetzen wir mit einem Tropfen der umgeschüttelten Kalziumkarbonatmilch.

Wir bringen nun eine Öse voll des Materials der Kolonie in ein Reagensgläschen mit steriler Nährlösung I, schütteln tüchtig um, bringen von der Mischung eine Öse voll in ein zweites Reagensglas mit Nährlösung I, schütteln wieder und stellen dann noch eine solche dritte Verdünnung her.

Aus jeder Verdünnung nehmen wir eine Öse voll der Flüssigkeit heraus und impfen je eins von drei Agarröhrchen damit. Dasselbe wiederholen wir mit den anderen drei Agarröhrchen. Dabei schütteln wir die Röhrchen nicht, sondern rühren nur mit der Platinöse ruhig um, damit keine Luftblasen im Agar entstehen. Die sechs Röhrchen gießen wir dann in Petrischalen aus und lassen in diesen den Agar völlig erstarren, im Sommer auf Eis, im Winter in einem kalten Raume. Um ein völliges Schließen der Petrischalen zu vermeiden, hängen wir über den Rand der kleineren Schale ein Häkchen aus sterilem, dickem Messingdraht und decken dann den Deckel auf.

Die nötige Anzahl von Exsikkatoren haben wir uns in folgender Weise hergerichtet. Wir stellen in den reinen, von Fett völlig befreiten Exsikkator eine offene Petrischale mit Dextroseagar, deren Oberfläche wir stark mit Bacillus subtilis geimpft haben. Auf diese Schale legen wir zwei Glasstreifen. Den Rand des Exsikkators fetten wir sorgfältig neu ein.

Auf die Glasstreifen über die Schale mit der Kultur von Bac. subtilis stellen wir unsere Kulturschalen, schließen den Exsikkator und pumpen ihn möglichst luftleer. Wir stellen dann den Exsikkator bei 28° in den Brutschrank und pumpen ihn alle Tage oder alle 2 Tage wieder aus. Wir lassen dann, vor Öffnung des Hahnes des Exsikkators, welcher mit der Luftpumpe verbunden ist, die Pumpe erst so lange in Tätigkeit, bis das Manometer in Ruhe bleibt.

Nach 2 Tagen können wir den Exsikkator einmal öffnen, um die Petrischalen zu untersuchen. Sind keine gut entwickelten Kolonien da, so setzen wir die Kultur fort und sehen alle 2 Tage nach. Eventuell drehen wir, wenn es nötig ist, die Schalen um, so daß die Agaroberfläche dann nach unten zeigt. Sind dann Kolonien vorhanden, so untersuchen wir sie mikroskopisch und impfen damit eventuell in Reagensgläsern befindlichen (schräge Fläche!) Heydenagar, Dextroseagar, der eventuell mit Kalziumkarbonat versetzt wird, sterile Möhrenstreifen

oder Kartoffelstreifen etc. Die Reagensgläser stellen wir in Exsikkatoren, neben Reagensgläser, welche Kulturen von Bacillus asterosporus oder Bacillus subtilis enthalten und pumpen diese Exsikkatoren so aus, wie wir es vorher kennen gelernt haben.

Kapitel XXII.

Die mikrochemischen Reagentien.

Alkohol absolutus.

Alkohol, 70 proz. (zur säurefesten Färbung).

Chloralhydratlösung. 5 g Chloralhydrat in 2 g Wasser gelöst.

Chlorzinkjodlösung. 30 g Chlorzink, 5 g Jodkalium, 0,8 g Jod, 14 ccm Wasser.

Eau de Javelle. (ARTHUR MEYER, Grundlagen und Methoden, 1901, S. 15). 200 g Chlorkalk (am besten in Packung von HEISTER aus den Apotheken zu beziehen) werden mit 1450 destill. Wassers fein verrieben, in eine mit gut schließendem Stöpsel versehene Flasche gegeben und mit einer Lösung von 250 g Natriumkarbonat in 450 g Wasser gemischt. Die Mischung wird unter wiederholtem Umschütteln vier Tage im Dunkeln stehen gelassen und dann filtriert. Das Filtrat wird so lange mit einer 10 proz. Kaliumoxalatlösung versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Nach dem Absetzen des Niederschlages wird filtriert.

Formol. Formaldehyd purissim., 35 proz.

Fuchsinlösung 1 + 10. 4 ccm Fuchsinlösung *g* und 40 ccm Wasser, kurz vor dem Gebrauche zu mischen.

Fuchsinlösung *g*, gesättigt, in 95-proz. Alkohol.

Fuchsinlösung *k*, zur Kernfärbung. Fuchsinlösung *v* 15 Tropfen, Wasser 10 ccm; kurz vor dem Gebrauche zu mischen.

Fuchsinlösung *v*, verdünnte. 2 ccm Fuchsinlösung *g*, 10 ccm Alkohol, 10 ccm Wasser. Darf nicht zu alt werden.

Anilinfuchsin (EHRLICH's Lösung). Muß 12 Stunden absetzen, wenn sie keinen Farbstoffniederschlag auf dem Präparate geben soll, und muß möglichst frisch angewandt werden.

2 ccm Anilin werden mit 50 ccm Wasser geschüttelt. Die Lösung wird durch ein feuchtes Filter gegossen. Dem klaren Filtrate setzt man 5 ccm Fuchsinlösung *g* hinzu.

Gelblösung. 0,2 g Dimethylamidoazobenzol (Buttergelb) in 50 ccm 95 proz. Alkohol gelöst.

„Gramjodlösung“ (GRAM 1884). 1 g Jod, 2 g Jodkalium, 300 g Wasser.

„Gramviolett“-Anilinwasser-Gentianaviolett (EHRLICH, 1882). 4 ccm Anilinöl werden mit 100 ccm Wasser geschüttelt; die Lösung wird durch ein angefeuchtetes Filter gegossen. Zum Filtrate setzt man 11 ccm einer gesättigten Lösung von Methylviolett (BB, chem. rein, Höchst) in 95prozentigem Alkohol. Die Lösung ist erst nach 12 bis 24 Stunden brauchbar und hält sich nur wenige Wochen.

Jodjodkaliumlösung *k*. konzentrierte. 3 g Jod, 3 g Jodkalium, 20 ccm Wasser.

Jodkaliumlösung *sch*, schwächere. 2 g Jod, 1 g Jodkalium, 200 ccm Wasser.

Karbolfuchsin (ZIEHL'sche oder NEELSEN'sche Lösung). 100 ccm fünfprozentige, filtrierte Karbolsäurelösung und 10 ccm Fuchsinlösung *g*. Darf nicht zu alt werden.

Methylenblaulösung 1 + 10 g. 1 Vol. der Methylenblaulösung *g* und 10 Vol. Wasser. Darf nicht zu alt werden.

Methylenblaulösung *g*, gesättigte; hergestellt mit 95-prozentigem Alkohol. (Ueber Methylenblau siehe MICHAELIS, Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., 1901, Bd., XXIX. S. 763.)

Methylenblaulösung *v*, verdünnte. 1 Vol. Methylenblaulösung *g*, 40 Vol. Wasser. Darf nicht zu alt werden.

Methylviolettlösung *g*, gesättigte, in 95prozentigem Alkohol. Als Methylviolett verwenden wir „Methylviolett B.B. chem. rein, Höchst“, welches von Dr. SIEBERT & ZIEGENBEIN in Marburg a/L. bezogen werden kann oder von GRÜBLER. Es ist auch als „Gentianaviolett“ zu verwenden.

Fünfprozentige Natriumkarbonatlösung. 2,5 g Soda, 30 g destilliertes Wasser.

Osmiumsäurelösung. Osmiumsäure (Acidum osmicum cryst.) 0,5 g, der Inhalt eines Röhrchens, gelöst in 50 ccm Wasser.

Salzsäurealkohol 3 + 100. 3 ccm Salzsäure und 100 ccm 95prozentiger Alkohol.

Safraninlösung. 0,1 g alkohollösliches Safranin, 50 ccm 95-prozentiger Alkohol, 50 ccm dest. Wasser.

Einprozentige Schwefelsäure. 5 ccm fünfprozentige Schwefelsäure, 45 ccm Wasser.

Fünfprozentige Schwefelsäure. 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 95 ccm Wasser.

Sudanlösung. 0,1 g Sudan III (Amidoazobenzolazo-β-naphthol, von GRÜBLER & Co., Leipzig) in 20 ccm 95prozentigem Alkohol gelöst. Auch Fettponceau ist in gleicher Weise zu empfehlen (LEONOR MICHAELIS, Deutsche medizinische Wochenschrift 1901, Nr. 12).

Kapitel XXIII.

Verzeichnis der allgemeinen Litteratur und der Bezugsquellen.

A. Litteratur.

ABEL, Taschenbuch für bakteriologische Praktikanten, enthaltend die wichtigsten technischen Detailvorschriften zur bakteriologischen Laboratoriumsarbeit, 5. Auflage, Würzburg 1900. — FLÜGGE, Die Mikroorganismen, I. Teil, Leipzig 1896; II. Teil, 1896. — KARL GÜNTHER, Einführung in das Studium der Bakteriologie, 5. Auflage, Leipzig 1898. — HEIM, Lehrbuch der bakteriologischen Untersuchung und Diagnostik, Stuttgart 1894. — HUEPPE, Die Methoden der Bakterienforschung. 5. Auflage, Wiesbaden 1891, O. W. Kreidel. — ALB. KLÖCKER, Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe, mit besonderer Berücksichtigung der Einrichtungen und Arbeiten gärungsphysiologischer und gärungstechnischer Laboratorien, Stuttgart

1900. — ALFRED KOCH, Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungsorganismen, Braunschweig, Harald Bruhn. — LEHMANN und NEUMANN, Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, München 1896. — ERNST LEVY und HAYO BRUNS, Bakteriologischer Leitfaden, II. Auflage des Bakteriologischen Nachschlagebuches von ERNST LEVY und SIDNEY WOLF; Strassburg i. E. 1901, Ludolf Beust. — PAUL LINDNER, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, I. Auflage 1895, III. Auflage 1901, Parey. — ARTHUR MEYER, Erstes mikroskopisches Praktikum, Jena, Verlag von Gustav Fischer, 1898. — W. MIGULA, System der Bakterien, Bd. I, Allgemeiner Teil, Jena, Gustav Fischer, 1897. — W. MIGULA, System der Bakterien, Bd. II.

B. Bezugsquellen.

PAUL ALTMANN, Berlin NW, Luisenstrasse 47 (Bakteriologische Gerätschaften). — GUSTAV CHRIST & Co. Berlin S, Fürstenstraße 17 (Autoklaven, Heissluft-Sterilisier-Apparate, Zentrifugen etc.) — GREINER und FRIEDRICHS, Stützerbach i. Th. (alle Glasgeräte). — Dr. G. GRÜBLER & Co., Leipzig (Farbstoffe, Agar etc.). — FRANZ HUGERSHOFF, Leipzig, Albertstraße 28 (Brenner, Titrierapparate etc.). — KRAL, Bakteriologisches Laboratorium, Prag I, Kleiner Ring 11 (Kulturen von Bakterien). — LAUTENSCHLÄGER, Berlin N., Oranienburger Straße 54 (Bakteriologische Apparate). — E. A. LENTZ, Berlin C., Spandauer Straße 36/37 (Sterilisierungsapparate, Zentrifugen, Wasserbäder, Brenner etc.). — AUG. LÜMKEMANN, Dortmund, Dampf-Desinfektions-Apparate-Fabrik, System Budenberg (Dampfsterilisatoren). — E. MERCK, chemische Fabrik, Darmstadt (Chemikalien). — ROBERT MUENCKE, Berlin NW., Luisenstraße 58 (Bakteriologische Apparate etc.). — Dr. HERMANN ROHRBECK (J. F. LUHME & Co.), Berlin NW., Karlstraße 20a (Bakteriologische Apparate). — SCHILLING, Gehlberg i. Th. (Exsikkatoren). — Dr. SIEBERT & KÜHN, Kassel, Hohenzollernstraße 4 (Glasbläserarbeiten und Glasgeräte). — Dr. SIEBERT und Dr. ZIEGENBEIN, Marburg a. L. (Farbstoffe und Chemikalien). — FRIEDRICH WITTE, Rostock i. M. (Pepton).

Figurenerklärung für die farbige Tafel.

Vergrösserung der Figuren verschiedenartig.

Fig. 1. Bacillus alvei mit Volutanskugeln, lebend mit Methylenblau 1 + 10 gefärbt.
Fig. 2, 3, 4. Bacillus alvei nacheinander mit Methylenblau, Jodjodkalium, Natriumkarbonat behandelt.
Fig. 5. Sporangium von einem „Granulobacter" mit viel Jod behandelt.
Fig. 6. Sporangium desselben Spaltpilzes mit sehr wenig Jod behandelt.
Fig. 7. Sporangium mit durch Jod gefärbtem Glykogene von Bacillus asterosporus. Agarkultur.
Fig. 8, 9. Sporen von Bacillus tumescens, von der Seite gesehen, mit Exine und Intine, mit Safranin gefärbt.
Fig. 10. Sporen von Bacillus tumescens, von oben gesehen, mit Safranin gefärbt.
Fig. 11. Keimende Spore von Bacillus tumescens.
Fig. 12. α Keimstäbchen, β leere Sporenmembran von Bacillus tumescens.
Fig. 13. Gekeimte Spore mit zweistäbigem Zellfaden von Bacillus tumescens, gefärbt mit Formolfuchsin.
Fig. 14. Schwärmoidie aus 12 Stunden alter Kultur von Bacillus tumescens; Formolfuchsin.
Fig. 15. Fettfreie Schwärmoidie mit 6 Kernen, von Bacillus tumescens; Formolfuchsin.
Fig. 16. Mit Methylenblau 1 + 10 gefärbte Oidien.
Fig. 17 und 18. Mit Methylenblau gefärbte, fetthaltige Stäbchen von Bacillus tumescens.
Fig. 19—22. Sporenentwicklung in den Sporangien von Bacillus tumescens. Bei tiefer Einstellung gezeichnet.
Fig. 23—25. Mit Methylenblau-Sudan gefärbte Sporangien von Bacillus tumescens.
Fig. 26—28. Bacillus tumescens nach der Formolfuchsin-Gelb-Methode gefärbt.
Fig. 26 A. In Auflösung begriffenes Stäbchen, dessen Zytoplasma gelöst ist, mit Sudan gefärbt.
Fig. 29 u. 29 a. Fig. 29. Sporen von Bacillus tumescens; 29 a: dieselbe Spore mit Eau de Javelle behandelt.
Fig. 30, 31, 32. Bacillus tumescens, fixiertes Material, 10 Sekunden mit Fuchsin v gefärbt.
Fig. 33, 34, 35 36, 37. Bacillus tumescens, fixiert, 60 Sekunden warm mit Fuchsin v gefärbt.
Fig. 38, 39, 40. Spore, Keimstäbchen und Sporangien von Bacillus tumescens nach der Säurefestigkeits-Methode gefärbt.
Fig. 41, 42, 43. Spore, Keimstäbchen, Sporangium nach Gram gefärbt.
Fig. 44. Spirillum volutans mit Gelblösung und Methylenblau 1 + 10 gefärbt. Obj. $^1/_{12}$, Komp. Ok. 12, gezeichnet von Herrn Grimme.
Fig. 45, 46. Bacillus ruminatus.
Fig. 47, 48. Bacillus tumescens.
Fig. 49, 50. Bacillus graveolens.
Fig. 51, 52, 53, 54. Bacillus Petasites.
Fig. 55, 56, 57. Bacillus Ellenbachensis.
Fig. 58, 59, 60. Bacillus mycoides.
Fig. 61, 62, 63. Bacillus subtilis.
Fig. 64, 65. Bacillus pumilus.
Fig. 66, 67, 68, 69. Bacillus simplex.
Fig. 70, 71, 72, 73. Bacillus cohaerens.
Fig. 74, 75, 76, 77. Bacillus fusiformis.

Register.

Ant. Kämpfe, Buchdruckerei, Jena

